

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Energética e interacciones de especies sencillas y
macromoleculares con interés fundamental, biológico y
tecnológico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco Javier González Alonso

Director

Juan Zenón Dávalos Prado

Madrid, 2017

Tesis Doctoral

Departamento de Química Analítica



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID

Energética e interacciones de especies
sencillas y macromoleculares con interés
fundamental, biológico y tecnológico

Autor: Francisco Javier González Alonso
Director: Juan Zenón Dávalos Prado
Madrid 2015





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

TESIS DOCTORAL

*Energética e interacciones de
especies sencillas y macromoleculares
con interés fundamental, biológico y
tecnológico.*

AUTOR

D. Francisco Javier González Alonso

DIRECTOR

Dr. Juan Zenón Dávalos Prado

Científico Titular del CSIC. Instituto de Química-Física Rocasolano



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Química-Física Rocasolano

Madrid, 2015

Cuando eres pequeño te dicen que todo es... crece, encuentra un trabajo, cástate, consigue una casa, ten un hijo... Pero la verdad es que el mundo es mucho más raro que eso. Y mucho más oscuro. Y mucho más loco. Y mucho mejor.

The Doctor Who

Dedicado a título póstumo a mi tío Evaristo, por enseñarme lecciones que no se aprenden en las aulas. A mis padres, Isidro y Magdalena sin cuyos sacrificios yo no estaría aquí y todo esto no sería posible y a Cristina, por estar ahí en todos los momentos, también en los más oscuros, incondicionalmente, en silencio y sin pedir nada a cambio.

Nuestra propia existencia es en sí misma lo más parecido a un milagro. Para existir en este momento y lugar, tuvieron que agruparse de algún modo, de una forma compleja e ininteligible, trillones de átomos errantes. La causalidad de este hecho es tan rara y tan particular que nunca se ha producido antes y nunca ocurrirá otra vez. Podríamos decir que nuestra existencia es un fenómeno singular en el espacio-tiempo. Todas estas pequeñas partículas participarán silenciosamente en los millones de tareas cooperativas necesarias para experimentar ese curioso estado, tan a menudo infravalorado, que llamamos existencia. A pesar de la improbabilidad de este suceso, existimos.

Sin embargo, fútil sería esta existencia sin lo que algunos llaman espíritu o conciencia y a mí me gusta llamar factor humano. Es gracias a este factor humano por lo que somos capaces de emprender encomiables tareas que nos hacen avanzar y mejorar como personas. Sin duda alguna, esta tesis es una de estas tareas, y sin duda también hubiera sido imposible concluirla sin el apoyo de las personas que me han ayudado y apoyado incondicionalmente. Por esta razón, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas esas personas, que de una forma u otra me han apoyado para terminar la tesis, creciendo como persona.

A mi director de tesis, el Dr. Juan Z. Dávalos, que me dio la oportunidad de emprender este trabajo y me fue guiando con paciencia y sabiduría.

A todos los compañeros que me han acompañado durante este viaje: Andrés, cuyo compañerismo me enseñó a evolucionar, Antonio, siempre sabio y con ideas que aportar, a Gemma, trabajadora infatigable y gran persona y a Rocío por aliviar la siempre pesada carga del trabajo de doctorando.

A la Dra. Pilar Jiménez por su afecto, convirtiéndose en la madre científica del grupo.

Al Dr. Carlito Lebrilla por permitirme aprender tanto sobre espectrometría de masas en su laboratorio de California.

Al Dr. Tomas Baer, de espíritu inquebrantable, entusiasta empedernido y científico motivador donde los haya.

Al Dr. Nikolai Kuhnert, quien me acogió en su laboratorio, me enseñó y me brindó la oportunidad de continuar con él.

A los Drs. Andras Bodi y Patrick Hemberger que me acogieron y enseñaron los entresijos del sincrotrón y la línea VUV en Suiza.

De una forma más especial si cabe, me gustaría darle las gracias a:

Mi amigo Rubén, creador de buenas ideas, cuyo apoyo técnico o moral fue de gran valía para llegar hasta aquí.

Mis amigos Roberto y Abhi, buenas personas y mejores científicos.

Mis amigos Manuel, Carlos, David y Miguel Ángel (Pasa, Charlie, Soco y Corredera) y Marta que si bien la tesis les parece un marciano incomprensible, saben de su importancia y siempre me proporcionaron los momentos necesarios para distraerme de ella, recargar las pilas y retomarla con firmeza, haciendo lo que mejor saben, ser amigos.

A mis amigos, porque limitarme a denominarlos compañeros de laboratorio es quedarse muy corto, Carlos, Silvia, Ioanna, Lara, Manu y Bego, todos ellos miembros del mismo club, el de los fatigosos doctores o casi. Su apoyo, casi terapéutico en algunos momentos y ellos mismos son lo mejor que me llevo de esta experiencia.

A Nicole, quien supuso un rayo de luz en el momento más oscuro.

A mi amigo Adolfo (Txolfo) por enseñarme que caer sólo es el principio para volverse a levantar, que la vida es una lucha y que sólo dejamos de estar vivos cuando nos rendimos.

A mi gran amigo Jesús, la mejor persona que se pueda conocer, duro como el pedernal y merecedor de todo mi respeto y lealtad.

A mi familia, especialmente mis hermanos y mis padres, porque siempre han estado, están y estarán ahí.

En último lugar, a Cris, la mejor compañera posible en el arduo, pero espero largo viaje de mi vida.

Resumen

En la presente tesis se recoge el trabajo realizado por el doctorando en el grupo de espectrometría de masas del Instituto de química física Rosacosalo, parte del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Los **objetivos** del trabajo se redujeron en un principio a estudios de energética y estructura molecular en fase gas mediante espectrometría de masas y la aplicación de la misma técnica a la resolución de problemas analíticos. Al acometer dichos objetivos, surgió uno posterior: el desarrollo de una metodología capaz de distinguir isómeros estructurales presentes en mezclas complejas usando métodos derivados de los empleados para alcanzar el primer ítem. Dentro del conjunto de moléculas sometidas a estudio se tomaron muestras con intereses diversos: fundamental, biológico y tecnológico.

Para alcanzar estos objetivos, se emplearon **metodologías** diversas como el método cinético extendido desarrollado por G. Cooks, la determinación de la sección eficaz con programas de simulación diseñados por el Pr. Peter Chen y la técnica denominada iPEPICO (*imaging PhotoElectron Photolon Coincidence*). Para los problemas de analítica se empleó cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con diversos detectores: triple cuadrupolo, trampa iónica y FT-ICR.

En la tercera y última fase del trabajo de investigación se ha desarrollado una metodología novedosa para la distinción de isómeros estructurales en fase gas mediante espectrometría de masas. Esta última parte surgió de la unión de las dos primeras.

Así pues, cabe destacar los siguientes **resultados** alcanzados:

1. *GA* en moléculas polifuncionales: ácidos hidroxicinámicos: este es uno de los primeros trabajos recogidos en la literatura donde se determinó la *GA* de moléculas polifuncionales.
2. *GA* en ácido barbitúrico y derivados: se midió la *GA* también en dos puntos. Los resultados concuerdan perfectamente con los calculados computacionalmente.

3. Caracterización termoquímica del paracetamol: se determinó la GA de esta molécula con interés farmacológico, encontrando una alta consistencia con los datos computacionales.
4. GA de complejos aminoboranos: se determinó la GA de una serie de complejos aminoboranos. Se midió y justificó computacionalmente el sorprendente incremento de acidez de grupos amino.
5. Estudio de closo-1-COOH-1,7-C₂B₁₀H₁₁ y derivados aminoácidos: se llevó a cabo el estudio de moléculas con posibles aplicaciones biológicas y tecnológicas. Se comparó sus GAs con las moléculas homólogos de carbono. Los cálculos computacionales, una vez más, demostraron una buena concordancia con los resultados experimentales, confirmando estos últimos.
6. Estudio estructural del complejo cloroquina plata: se determinó la estructura del complejo formado por esta molécula con propiedades antimaláricas y un átomo de plata. Se observó y determinó la variedad de estructuras que puede formar tanto en sólido como en disolución.
7. Oligomerización aniónica de Li₂[B₁₂H₁₂] y Li[CB₁₁H₁₂]: se estudiaron las múltiples estructuras en que se organizan estos compuestos en fase gas y se pudo determinar la sección eficaz del dímero de Li[CB₁₁H₁₂] unido con un átomo de Li.
8. Propiedades estáticas y dinámicas del binol: se llevó a cabo una caracterización completa de las propiedades moleculares del binol, siendo la GA una de ellas.
9. Activación de enlaces C(sp³)-H intramoleculares en complejos de platino sulfonados: resultado de una intensa colaboración, se sintetizaron y caracterizaron una serie de complejos organometálicos de platino para los cuales se observó una activación de carbonos sp₃ mediante adición oxidativa. Se propuso una serie de mecanismos derivados de las fragmentaciones hechas mediante espectrometría de masas que se confirmaron mediante cálculos computacionales.
10. Dinámica de disociación y calor de formación de tetraetilsilano: se determinó la entalpía de formación a 0 K y a 298 K del tetraetilsilano mediante su disociación con iPEPICO.
11. Impacto de extractos de levaduras secas enriquecidas en glutatión sobre la estabilidad de terpenos durante el envejecimiento del vino: se probaron extractos de levadura en vinos sintéticos como antioxidantes naturales. Se confirmó el

potencial antioxidante de estos extractos, siendo incluso mayor que el de la molécula GSH (glutathión reducido), molécula de referencia en estos trabajos. Para averiguar que otros compuestos sulfurados podían estar implicados en estos procesos oxidativos, se realizó un análisis metabolómico no dirigido mediante CEMS y FT-ICR-MS.

12. Descomposición térmica de almidón y celulosa en pan tostado y sistema modelo: se estudiaron los procesos de degradación de polímeros hidrocarbonados naturales (almidón y celulosa) por efecto del calor así como la caramelización de la glucosa. Se establecieron modelos para estos procesos basados en los resultados derivados de la espectrometría de masas y técnicas de quimiometría.
13. Resolución de isómeros: usando los conceptos de los trabajos previos, se desarrolló un método para distinguir isómeros estructurales basado en su energética en fase gas. Este método, diseñado empleando ácidos clorogénicos como ejemplo, fue testado sobre muestras reales complejas extraídas de plantas de la familia Lonicera.

Como **conclusión** principal puede decirse que este amplio abanico de trabajos ha sido posible sin duda a la gran variedad de equipos empleados para su desarrollo; muchos de ellos comerciales y otros no (iPEPICO). No obstante, el entendimiento pleno de los procesos estudiados no podría haberse alcanzando sin la complementación de los resultados experimentales con los computacionales. La racionalización de los resultados fue realizada mediante métodos DFT y *ab initio*.

Summary

The present thesis collects the work carried out by the PhD student in the Mass Spectrometry group pertaining to the Rocasolano Physical-Chemistry Institute, part of the Spanish National Research Council.

The **aims** were initially two: on one hand, studies in the energetics and structural fields in gas phase by mass spectrometry and on the other hand, the resolution of classical analytical issues. Undertaking these two tasks, one more aim showed up: the development of a novel methodology in order to distinguish structural isomers in complex mixes. To reach this aim, the employed methods in the first part were applied to get a derivative one. Within this work, a selection of molecules with a wide type of interests was done.

To accomplish the aforementioned aims, several **methodologies** were used: the extended kinetic method developed by G. Cooks, the Peter Chen's method to find the bond energy in a molecule or the iPEPICO technique (*imaging Photo Electron Photo Ion Coincidence*). Regarding to analytical issues, several instruments were employed: a liquid chromatographer, a triple quadrupole, an ion trap and a FT-ICR.

Therefore, it should be pointed out the next **results** achieved during the development of this thesis:

1. Gas phase acidity (GA) in polyfunctional molecules: hydroxycinnamic acids have been one of the first examples where the gas phase acidity was found in two atoms of the same molecule.
2. GA in barbiturics acids: this was also other example of the same methodology. The results have a great agreement with those found by computational works.
3. Thermodynamic characterization of paracetamol: GA was found with great agreement between the experimental and computational results.
4. Measurement of GA in a serial of amineborane complexes with a surprising increment in the parameter and a corresponding justification by means of computational chemistry.

5. Study of GA in closo-1-COOH-1,7-C₂B₁₀H₁₁, comparing the found results with the homologue molecules made of carbon. In this case the agreement between calculations and experiments was excellent too.
6. Structural study of silver-chloroquine complex: a variety of structures were found in solid phase as well as liquid phase.
7. Anionic oligomerization of Li₂[B₁₂H₁₂] y Li[CB₁₁H₁₂]: numerous structures were found and the way they organize in gas phase. On the other hand the bond energy of Li--[CB₁₁H₁₂] was found as well.
8. Static and dynamic properties of binol: GA and other structural properties were studied.
9. Intramolecular bonds activation in C(sp³)-H in sulfured platinum complexes. Synthesis, characterization and study in gas phase by mass spectrometry.
10. Dissociation dynamics and heat formation of tetraethylsilane at 0 K and 298 K by iPEPICO.
11. Impact of glutathione-enriched inactive dry yeast preparations on the stability of terpenes during model wine aging.
12. Investigating the thermal decomposition of starch and cellulose in model systems and toasted bread using domino tandem mass spectrometry.
13. Structural isomer resolution: a new method to distinguish structural isomers was developed. This method is based on some methodologies employed in previous papers of our group. The fundament of this method is the energetic in gas phase, being capable of find small differences in the bond energy of several isomers.

The main **conclusion** that we can achieve is the wide combination of instruments and techniques used has been decisive to get the numerous results. Many of that instruments are commercially available, but not all of them, for instance iPEPICO what is manually made. However, the whole understanding of these results had been not possible without the corresponding rationalization by computational chemistry.

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES.....	17
2.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	17
2.1.1 HPLC.....	17
2.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS	18
2.2.1 <i>Perspectiva histórica</i>	18
2.2.2 <i>Fundamentos de la espectrometría de masas</i>	19
2.2.2.1 Fuentes de ionización	20
2.2.2.1.1 Electrospray (ESI).....	20
2.2.2.1.2 MALDI	21
2.2.2.2 Analizadores de Masas	22
2.2.2.3 Detectores	23
2.2.2.4 Sistema de Vacío.....	24
2.2.3 <i>Fragmentación en espectrometría de masas</i>	24
2.2.4 <i>Guías n-polares</i>	26
2.2.5 <i>Espectrómetro de triple cuadrupolo</i>	27
2.2.5.1 Disociación Inducida por Colisión (CID).....	29
2.2.5.2 Espectrómetro utilizado	30
2.2.6 <i>FT-ICR</i>	30
2.2.6.1 Fundamentos.....	30
2.2.6.2 Celda de confinamiento de iones.....	31
2.2.6.4 Exitación	33
2.2.6.5 Detección.....	34
2.2.6.6 Características	36
2.2.6.7 Sistemas de Fragmentación en FT-ICR	38
2.2.6.7.1 SORI-CID.....	38
2.2.6.7.2 Disociación por radiación Infrarroja Multifotónica	39
2.2.6.8 Espectrómetros utilizados	40
2.2.7 <i>Espectrometría iPEPICO</i>	41
2.2.7.1 Fotoionización	42

2.2.7.2 Fundamentos.....	43
2.2.7.3 Funcionamiento.....	44
2.2.7.4 Espectrómetro empleado.....	44
2.2.8 Trampa Iónica Cuadrupolar (QIT).....	45
2.2.8.1 Fundamentos.....	45
2.2.8.2 Espectrómetro empleado.....	47
3. MÉTODOS COMPUTACIONALES.....	48
3.1 MECÁNICA MOLECULAR.....	48
3.2 TEORÍA DE LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA	49
3.2.1 Aproximación de Born-Oppenheimer: superficies de energía potencial .	49
3.2.2 Puntos Críticos	51
3.2.3 Energía vibracional	52
3.2.4 Energía electrónica	53
3.2.4.1 Métodos semiempíricos	54
3.2.4.2 Métodos <i>ab initio</i>	54
3.2.4.3 Métodos de funcional de densidad.....	56
3.2.5 Conjuntos de bases	57
3.3 MÉTODOS EMPLEADOS	60
4. RESULTADOS.....	62
4.1 ACIDEZ Y BASICIDAD EN FASE GAS	64
4.1.1 GA en moléculas polifuncionales: ácidos hidroxicinámicos.....	67
4.1.1.1 Introducción	67
4.1.1.2 Resultados	68
4.1.1.3 Condiciones experimentales	69
4.1.1.4 Conclusiones.....	71
4.1.2 GA en ácido barbitúrico y derivados.....	71
4.1.2.1 Introducción	71
4.1.2.2 Método Experimental.....	72
4.1.2.3 Detalles computacionales	73
4.1.2.4 Selección del dímero unido por enlace de hidrógeno	74
4.1.2.5 Resultados	76

4.1.2.6 Conclusiones	79
4.1.3 <i>Caracterización termoquímica del paracetamol</i>	79
4.1.3.1 Introducción	79
4.1.3.2 Resultados	80
4.1.3.3 Conclusiones	80
4.1.4 <i>La sorprendente acidez intrínseca (GA) de complejos amino-boranos ...</i>	80
4.1.4.1 Introducción	80
4.1.4.2 Resultados	81
4.1.4.3 Conclusiones	83
4.1.5 <i>Estudio de closo-1-COOH-1,7-C₂B₁₀H₁₁ y derivados aminoácidos</i>	83
4.1.5.1 Introducción	83
4.1.5.2 Resultados	84
4.1.5.3 Conclusiones	86
4.2 ESTRUCTURA Y ENERGÉTICA	86
4.2.1 <i>Estudio estructural del complejo cloroquina-plata</i>	87
4.2.1.1 Introducción	87
4.2.1.2 Resultados	88
4.2.1.3 Conclusiones	90
4.2.2 <i>Oligomerización aniónica de Li₂[B₁₂H₁₂] y Li[CB₁₁H₁₂]</i>	90
4.2.2.1 Introducción	90
4.2.2.2 Resultados	91
4.2.2.3 Conclusiones	95
4.2.3 <i>Propiedades estáticas y dinámicas del binol</i>	95
4.2.3.1 Introducción	95
4.2.3.2 Resultados	96
4.2.3.3 Conclusiones	97
4.2.4 <i>Activación de enlaces C(sp³)-H intramoleculares en complejos de platino sulfonados</i>	98
4.2.4.1 Introducción	98
4.2.4.2 Resultados	100
4.2.4.3 Conclusiones	104

4.2.5 <i>Dinámica de disociación y calor de formación de tetraetilsilano, clorotrietilsilano y diclorodietilsilano</i>	105
4.2.5.1 Introducción	105
4.2.5.2 Resultados	106
4.3 QUÍMICA ANALÍTICA	109
4.3.1 <i>Impacto de extractos de levaduras secas enriquecidas en glutatión sobre la estabilidad de terpenos durante el envejecimiento del vino</i>	109
4.3.1.1 Introducción.....	109
4.3.1.2 Discusión y resultados	110
4.3.1.3 Conclusiones.....	112
4.3.2 <i>Descomposición térmica de almidón y celulosa en pan tostado y sistema modelo</i>	113
4.3.2.1 Introducción	113
4.3.2.2 Discusión y resultados	114
4.3.2.3 Conclusiones.....	119
4.4 RESOLUCIÓN DE ISÓMEROS	120
4.4.1 <i>Introducción</i>	120
4.4.2 <i>Metodología experimental</i>	123
4.4.3 <i>Discusión y resultados</i>	125
4.4.4 <i>Conclusiones</i>	141
5. CONCLUSIONES	142
6. BIBLIOGRAFÍA	145
ANEXO	155

Abreviaturas

CAD	Collision-Activated Dissociation
CE-MS	Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry
CID	Collision-Induced Dissociation
ERMS	Energy Resolved Mass Spectrometry
EKM	Extended Kinetic Method
ESI	Electrospray Ionization
FAB	Fast Atoms Bombardment
FIA	Flow Injection Analysis
FTICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
iPEPICO	imaging Photoion Photoelectron Coincidence
IRMPD	Infrared Multiphoton Dissociation
LC	Liquid Chromatography
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MS	Mass Spectrometry
QIT	Quadrupole Ion Trap
Q-TOF	Quadrupole-Time of Flight
TQ	Triple Quadrupole

1. INTRODUCCIÓN

A menudo, una gran parte de los procesos que ocurren a nuestro alrededor se sustentan en los pilares básicos de la química: la ruptura de enlaces, la formación de otros nuevos y la energía asociada a estas transformaciones. La influencia del medio en estos procesos es decisiva, sin embargo, las moléculas por si mismas tienen una serie de propiedades denominadas intrínsecas. El conocimiento preciso de estas propiedades conlleva un mejor entendimiento de la relación de estas moléculas con su entorno, pudiendo obtener así información esencial [1]. Como ejemplo de este hecho se puede citar la dependencia de K_a (constante de disociación de un ácido) con el disolvente: el pK_a del ácido acético en agua es 4.75, mientras que en acetonitrilo es 23.51. La misma especie puede ser considerada un ácido fuerte o débil en función del entorno en que se encuentre. Sin embargo, este ácido, en fase gaseosa tiene una acidez de $1427.0 \pm 8.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ en términos de energía libre de Gibbs [2], no viéndose afectado por ningún factor externo.

El ejemplo anterior representa una de los procesos estudiados en esta tesis: procesos de transferencia protónica. Podríamos citar un sinnúmero de ejemplos en los que un enlace de hidrógeno interviene en procesos biológicos o tecnológicos, como por ejemplo, las reacciones que realizan las enzimas, que si bien están gobernadas principalmente por la estereoquímica, se ven estabilizadas por fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno, siendo este tipo de enlaces determinantes en la conformación de las mismas[3].

En otras ocasiones, puede resultar más necesario estudiar otro tipo de propiedades moleculares; el salto que supone pasar del estudio de un enlace de hidrógeno a la disociación de un residuo molecular completo supone ir un paso más allá. Dentro de este campo, resulta interesante determinar la estructura de un compuesto con interés tecnológico, como por ejemplo un complejo organometálico empleado como posible catalizador en la industria[4] o determinar la dinámica de disociación de un compuesto en presencia de luz ultravioleta, replicando las condiciones de la estratosfera[5, 6].

En general, existen diversas técnicas experimentales para estudiar sistemas en fase gas y determinar propiedades moleculares, sin embargo, de entre todas ellas, la espectrometría de masas se alza como una de las más completas; no sólo por el hecho de trabajar con iones aislados, tanto de contraiones como de disolvente, sino también por su rapidez, sensibilidad y precisión; características que hacen de esta técnica como una de las más potentes y prácticas para esta labor [7].

El interés de la química en fase gas radica en la capacidad de caracterizar sistemas moleculares complejos a partir de las propiedades básicas de la materia. A nivel práctico, áreas científico-técnicas como la ciencia de materiales [8], ciencia de los alimentos [9] y en general todas aquellas disciplinas englobadas en el sufijo “-ómicas”: metabolómica, lipidómica, proteómica, genómica, etc. han visto incrementada su popularidad gracias a la evolución de los sistemas analíticos de cromatografía y masas [10]. A su vez, la propia necesidad de aumentar el conocimiento existente sobre diferentes sistemas, provoca una evolución lógica de los instrumentos de trabajo, existiendo un “feedback” entre técnica y conocimiento científico [11].

Entre los objetivos de esta tesis se encuentran el estudio de propiedades químico-físicas en fase gas de moléculas biológicas y/o tecnológicas combinando herramientas teóricas y experimentales.

La espectrometría de masas ha sido la técnica experimental más importante que utilizamos en este trabajo tanto para los estudios de investigación básica como para su aplicación a problemas con un perfil analítico y el desarrollo de novedosas metodologías analíticas nacida de la unión de las dos partes.

La investigación básica de sistemas moleculares sencillos ha sido apoyada con cálculos computacionales, principalmente de tipo mecano-cuánticos (*ab-initio* y DFT) para racionalizar los resultados obtenidos.

El presente trabajo se divide en cinco capítulos:

El primero de ellos es una breve introducción al tema de la tesis doctoral y un somero esquema de la evolución del mismo.

El segundo capítulo describe ampliamente el abanico de técnicas instrumentales empleadas durante todo el período de tesis, a saber: cromatografía

líquida de alto rendimiento (HPLC), espectrómetro de triple cuadrupolo (TQ), trampa iónica cuadrupolar (QIT), resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FTICR) y espectrometría de coincidencia fotoion/fotoelectrón (iPEPICO).

En el tercer capítulo se habla sobre los métodos computacionales empleados así como sobre su importancia a la hora de corroborar y complementar los resultados experimentales obtenidos. Frecuentemente en este campo de investigación las técnicas experimentales únicamente vierten datos correspondientes a mecanismos solamente describibles a través de la química computacional.

En el cuarto capítulo se discuten los resultados obtenidos. La ordenación de este capítulo refleja la esencia misma del conjunto de la tesis. Se puede observar una clara evolución desde los trabajos de química fundamental (acidez-basicidad en fase gas, energías de activación y disociación fotoquímica) hasta sus aplicaciones en sistemas químicos más complejos.

El quinto y último capítulo resume las conclusiones generales de todo el trabajo.

Por último se incluye un anexo con una relación de todos los artículos científicos en los que el doctorando figura como coautor así como una copia de los mismos.

2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Teniendo en cuenta el trabajo de tesis realizado, este capítulo incluye una descripción de los equipos utilizados para este fin: cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectrómetro de triple cuadrupolo (TQ), cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), trampa iónica cuadrupolar (QIT), resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR) y espectrometría de coincidencia fotoión/fotoelectrón (iPEPICO). También se hace una descripción de las técnicas de ionización empleadas: electrospray (ESI) y MALDI. De ahora en adelante se citarán estas técnicas por sus acrónimos, en inglés, más comúnmente conocidos (ver tabla de abreviaturas).

2.1 Cromatografía Líquida

La cromatografía líquida es una técnica analítica especialmente útil para separar mezclas complejas. Para lograr esta separación se necesita poner la mezcla en contacto con una fase sólida o fase estacionaria retenida en el interior de una columna. Cuando la disolución pasa a través de la misma se produce un equilibrio por competitividad entre el disolvente y la fase estacionaria. Los diferentes analitos se verán retenidos por esta última un mayor o menor tiempo dependiendo de la constante de equilibrio. Cuando la composición del disolvente varía lo suficiente, este equilibrio se desplaza a favor del mismo, haciendo más solubles las moléculas retenidas en el interior de la columna. De esta forma es posible hacer que diferentes sustancias presentes en una misma disolución eluyan a diferentes tiempos facilitando así la labor de detección.

Mikhail Semyonovich Tsvet (1872–1919) está considerado como el padre de esta técnica al haber logrado separar por primera vez los diferentes pigmentos vegetales de una planta [12].

2.1.1 HPLC

En 1970 en los EE.UU., Jim Waters fundó Waters Corporación y comenzó a vender instrumentos de HPLC (*High Performance LiquidChromatography*). Se trata de un tipo

específico de cromatografía que utiliza una elevada presión en el interior de la columna para mejorar la eficiencia de separación.

Los cromatógrafos constan al menos de los siguientes componentes: desgasificador para el solvente, bombas de alta presión, sistema de inyección y columna cromatográfica. La mayor parte de los equipos actuales disponen además de un horno para trabajar a una temperatura definida y detector, tradicionalmente de absorción ultravioleta o un equipo de espectrometría de masas.

2.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas, más conocida por su acrónimo en inglés MS, es una técnica experimental que permite el estudio de moléculas y átomos en fase gas, previa ionización, mediante la determinación de su relación masa carga (m/z). La técnica ha jugado un papel crucial en los últimos 100 años en una gran variedad de disciplinas científicas. Tras su nacimiento a finales del siglo XIX para detectar rayos catódicos, han sido muchas y muy importantes las modificaciones que ha sufrido diversificando el mercado actual de espectrómetros de masas. Actualmente existen un buen número de equipos comerciales que se adaptan a las necesidades tanto tecnológico-industriales de cualquier tipo de industria (farmacéutica, petroquímica, alimentación, etc.) [13] como científicas.

2.2.1 Perspectiva histórica

En 1898 Wien demostró que un haz de rayos podía ser desviado por un campo eléctrico o magnético creado con dos placas superpuestas. Joseph J. Thompson (Nobel de Física en 1906) tan sólo unos años más tarde se percató de la desviación que sufrían haces de partículas cargadas en presencia de un campo magnético [14]. Por este hallazgo se le considera el padre de la espectrometría de masas. Hasta comienzos de la década de los 40, las mayores y casi únicas aplicaciones de la espectrometría de masas estuvieron dedicadas a la separación e identificación de isótopos atómicos. Con la llegada de la Segunda Guerra Mundial y el proyecto Manhattan la espectrometría de masas experimentó un gran auge de la mano de Alfred Nier, quien logró separar el isótopo fisionable de ^{235}U para la creación de la bomba atómica [15]. A la sombra de

estos avances en 1943 nace el primer espectrómetro de masas comercial y tan sólo unos años después se establecen los principios del funcionamiento del TOF y FTICR [16, 17].

En la década de los 50 su uso se extendió para el análisis de moléculas orgánicas y creció durante los siguientes veinte años. La aparición de la cromatografía de gases en los 60 marca el comienzo del análisis de mezclas relativamente complejas. Es en estos años cuando aparecen también las primeras técnicas de fragmentación y análisis MS/MS [18]. Durante este período se populariza esta herramienta para el análisis de muestras orgánicas (también por la aparición de la ionización química como fuente “soft”). Sin embargo no será hasta la década de los 80 cuando se produzca el auge definitivo con la aparición de las fuentes de ionización “suaves” (*soft ionization sources*): FAB en 1981 o bombardeo por átomos rápidos [19], ESI en 1984-1988 [20] y MALDI, 1988 [21]. Las dos últimas fuentes de ionización permitieron llevar a fase gas moléculas por encima de 100 kDa sin apenas descomposición, abriendo las puertas a la bioanalítica. De hecho, por el descubrimiento de ambas técnicas, John B. Fenn y Koichi Tanaka fueron galardonados con el Premio Nobel de Química en el año 2002. Desde entonces ha aparecido toda una gama de equipos híbridos como los Q-TOF, TOF-TOF, Q-FTICR, etc. que han ido mejorando las capacidades tanto cualitativas como cuantitativas en su uso comercial y académico. Lo más destacable de los últimos diez años es sin duda la invención y desarrollo del denominado Orbitrap por Alexander Makarov [22].

2.2.2 Fundamentos de la espectrometría de masas

La espectrometría de masas está basada en el movimiento de iones en presencia de un campo eléctrico y/o magnético. Para que esto sea posible primero han de generarse los iones, y después deben ser conducidos hasta el detector minimizando a ser posible la colisión con partículas de aire u otras moléculas. Así pues, todo espectrómetro de masas consta al menos de los siguientes elementos: fuente de ionización, analizador de masas, detector y sistema de vacío (figura 1).

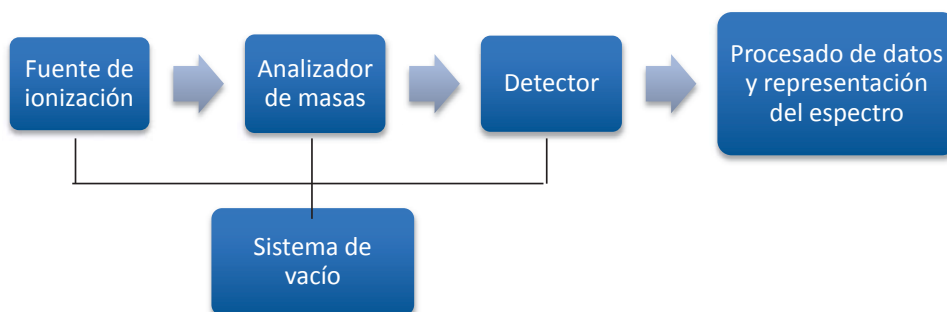


Figura 1. Representación esquemática de un sistema básico de espectrometría de masas.

2.2.2.1 Fuentes de ionización

Son dispositivos que convierten moléculas neutras en iones aislados (fase gas). Las fuentes de ionización pueden ser de varios tipos, externas o internas y “*soft*” o “*hard*”, aunque destructivas todas ellas. Que una fuente sea externa, significa que los iones se producen fuera del analizador de masas mientras que una fuente interna genera los iones ya dentro del analizador. Por fuentes *soft* se entienden todas aquellas que no generan fragmentación masiva a la hora de ionizar (ESI y MALDI), mientras que las denominadas *hard* son aquellas que si producen un gran número de fragmentos durante la ionización.

Si bien existen una gran cantidad de fuentes de ionización (APCI, EI, FAB, etc) solamente serán descritas a continuación aquellas que han sido utilizadas por el doctorando durante su trabajo de tesis.

2.2.2.1.1 Electrospray (ESI)

En esta fuente es necesario que la muestra esté disuelta a baja concentración en un disolvente volátil y polar. Esta disolución es nebulizada en una cámara en presencia de un gas de nebulización inerte (típicamente N_2 o aire) y convertida en micro gotas. Todo el sistema está en presencia de un fuerte campo eléctrico que facilita la polarización de las moléculas de disolvente [20]. Un flujo de aire caliente a contracorriente favorece la vaporización del disolvente, reduciéndose el diámetro de las gotas hasta alcanzar su radio crítico o límite de Raleigh [23]. Cuando se sobrepasa este límite, la densidad de carga de la esfera es lo suficientemente alta para que la repulsión electrostática resultante provoque la denominada explosión culombiana

[24]. Al final de este proceso, una gran parte de las moléculas quedan cargadas y desolvatadas (figura 2). Lo más habitual es encontrar iones con carga +1 ó -1, es decir, que hayan ganado o perdido un protón. No obstante pueden formarse aductos con Na^+ , K^+ , etc. (contaminantes habituales) y en el caso de moléculas suficientemente grandes, éstas pueden ser multicargadas.

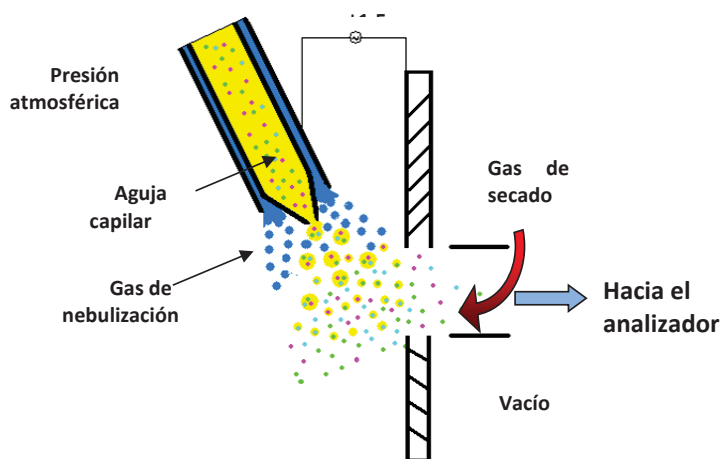


Figura 2. Esquema de una fuente ESI.

2.2.2.1.2 MALDI

MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) es una evolución de la desorción/ionización por láser nacida en los años 70 (LDI) [25]. Ambas técnicas son muy parecidas; un láser incide sobre una muestra cristalizada o depositada sobre una placa situada dentro de una cámara a vacío. La muestra absorbe la radiación haciendo que sus enlaces se exciten con suficiente energía como para convertirse en iones. Cuando esto ocurre, los iones forman una pluma de ablación y una parte entra en el analizador para ser conducido hasta el detector.

El gran inconveniente del LDI es que la radiación láser incidente provoca una degradación masiva del analito o muestra. Este problema se superó con la llegada de la técnica MALDI, desarrollado entre otros por Tanaka [21] quien modificó la técnica LDI introduciendo una matriz de soporte del analito (figura 3). La matriz que asiste a la

ionización no es más que un compuesto orgánico que hace las veces de intermediario en el proceso de ionización. Suelen ser compuestos cuyos máximos de absorción están próximos a la longitud de onda de emisión láser. Además de la coincidencia de máximos en la emisión-absorción, el otro requisito es que la matriz esté en una concentración mucho mayor que la muestra, para que sea esta la que capte la mayor parte de la energía. Se puede decir que la matriz es un disolvente. A diferencia de la anterior, MALDI solamente aporta una carga por ion.

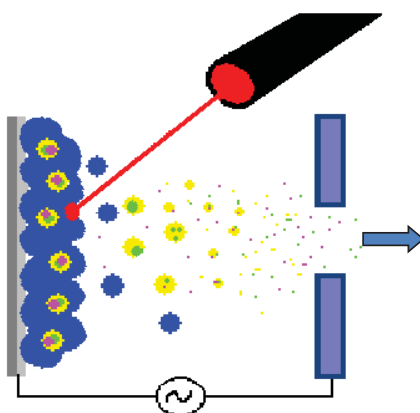


Figura 3. Esquema de una fuente de ionización tipo MALDI. En azul aparece la matriz, las esferas coloreadas en amarillo simbolizan los analitos y el haz rojo incidente el láser.

2.2.2.2 Analizadores de Masas

Los analizadores de masas son un elemento fundamental en la espectrometría de masas ya que permiten filtrar y mover los iones generados hacia el detector. Están compuestos por guías eléctricas y/o magnéticas que separan los iones y los mueven en función de su relación m/z . El movimiento de una partícula cargada sometida a un campo magnético y eléctrico viene definido por la ecuación siguiente:

$$\left(\frac{m}{z}\right) \vec{a} = \vec{E} + \vec{v} \times \vec{B} \quad (1)$$

Donde m es la masa de la partícula, z su carga, \vec{a} la aceleración a la que se ve sometida, \vec{E} el campo eléctrico, \vec{v} la velocidad y \vec{B} el campo magnético. Todos los analizadores de masas se basan en esta ecuación o en alguna derivada de esta para transportar y filtrar los iones generados. Al ser los analizadores de masas los que dan

nombre a los equipos que los incluyen, serán descritos con un mayor detalle aquellos que han sido utilizados durante el trabajo de tesis.

2.2.2.3 Detectores

La función de los detectores es revelar la presencia de partículas cargadas (iones) en forma de señales electrónicas que convenientemente amplificadas, discriminadas y tratadas serán registradas en forma de espectros. Existen dos categorías principales de detectores: focales planos y focales puntuales. La diferencia entre ambos es si detectan iones separados en el espacio o en el tiempo respectivamente.

Los detectores focales planos están constituidos por una matriz o *array* de semiconductores con superficie plana donde impactan los iones previamente separados según su relación m/z . Así pues todos los iones llegan al detector simultáneamente pero espaciados entre sí. Esta misma tecnología es la que usan las pantallas de las cámaras de fotos digitales donde una matriz o *array* de diodos colocados en un orden concreto captan la luz que les llega por el objetivo componiendo los diferentes píxeles de la imagen.

Los detectores focales puntuales detectan iones separados en el tiempo. El ejemplo más claro de este tipo lo encontramos en los espectrómetros de tiempo de vuelo. En este caso los iones alcanzan el *jumper*, pieza que provoca el vuelo de los iones mediante repulsión electrostática y viajan por un tubo de una cierta longitud. Dado que los iones más pesados vuelan más despacio, el tiempo transcurrido desde que se activa el *jumper* hasta que impactan con el detector será diferente para cada relación de m/z .

Además de necesitar un detector como tal, un espectrómetro de masas necesita un amplificador de señal. La mayoría de los que se encuentran en el mercado son del tipo multiplicador electrónico o multiplicadores electrónicos secundarios (del inglés *SEM o secondary electron multiplier*). Los amplificadores están formados por una serie de electrodos en serie. Entre cada dos electrodos se establece una diferencia de potencial creciente del orden de los kV. El rayo de iones incide sobre el primer electrodo, desprendiendo unos cuantos electrones que viajan hasta la siguiente placa

del fotomultiplicador gracias al campo eléctrico establecido. Cuando impactan por segunda vez, se generan nuevos electrones, amplificándose así la señal eléctrica.

2.2.2.4 Sistema de Vacío

Para que los iones generados en la fuente puedan ser transportados hasta el detector sin sufrir excesivas colisiones con moléculas de aire, es necesario que estén en un sistema de alto vacío con presiones comprendidas entre 10^{-6} y 10^{-11} mbar. Para este fin se utilizan bombas rotatorias y bombas turbomoleculares. Con las primeras se alcanza un vacío inferior a 10^{-3} mbar y se utilizan para dar apoyo a las segundas, con las que se puede llegar a 10^{-10} - 10^{-11} mbar.

2.2.3 Fragmentación en espectrometría de masas

Un espectro de masas nos proporciona una información valiosa para la identificación de especies. Sin embargo cuando este es complementado con técnicas de separación (HPLC y GC) y de fragmentación MS^n , la información disponible se ve considerablemente potenciada por la caracterización estructural de las especies analizadas. Fue a finales de la década de los 60 cuando se utilizó por primera vez la tecnología de fragmentación [18]. Si además el detector de masas es de alta resolución, la identificación de las especies registradas puede ser inequívoca.

Los espectrómetros que incluyen dispositivos de fragmentación tienen un rasgo en común: la posibilidad de aislar el ion deseado de entre todos los que entren en un momento dado al analizador de masas. El proceso de aislamiento y fragmentación puede llevarse a cabo en el espacio o en el tiempo. Un ejemplo del primer caso son los triples cuadrupolos, donde los iones se seleccionan en una determinada zona y se fragmentan en otra diferente. En general todos los instrumentos híbridos pertenecen a este tipo. Dentro del segundo conjunto (“selección temporal”) entran todos los equipos de tipo trampa: FT-ICR, trampa iónica, Orbitrap, etc. La principal ventaja de los analizadores temporales es la posibilidad de romper el mismo ion sucesivamente (MS^n), obteniendo una mayor información estructural.

Las aplicaciones de la fragmentación van mucho más allá de la determinación estructural de una molécula. Teniendo en cuenta la alta precisión en las energías de

fragmentación, también se pueden llevar a cabo trabajos de energética molecular en fase gas.

La fragmentación de iones no aporta únicamente información de tipo estructural. También tiene un gran potencial para la determinación de propiedades intrínsecas que, como su nombre indica, dependen sólo de la estructura molecular y no del entorno que los rodea. Con el control preciso de las energías de fragmentación a través de las diferentes técnicas existentes, es posible determinar la energía umbral para una disociación específica [26], la acidez o basicidad de un compuesto [27], el potencial de ionización [28] o la afinidad por sales [29].

Mediante la fragmentación de un ion y su posterior análisis es posible dilucidar aspectos estructurales de la molécula en cuestión. La disociación de enlaces moleculares, siempre y cuando sea de carácter heterolítica, produce iones de menor tamaño que el precursor. Como ejemplo, se muestra en la figura 4 un espectro de fragmentación del compuesto organometálico $MPrPtMe_2$. En este caso se empleó IRMPD como técnica de fragmentación. Las técnicas de fragmentación de iones son ampliamente utilizadas en campos tan diferentes como el farmacológico, para el estudio de productos naturales [30, 31], metabolómica[32], química analítica general [33], etc. En la mayoría de los casos, existe además la posibilidad de cotejar los resultados obtenidos con una base de datos que hace mucho más ágil la identificación de la sustancia.

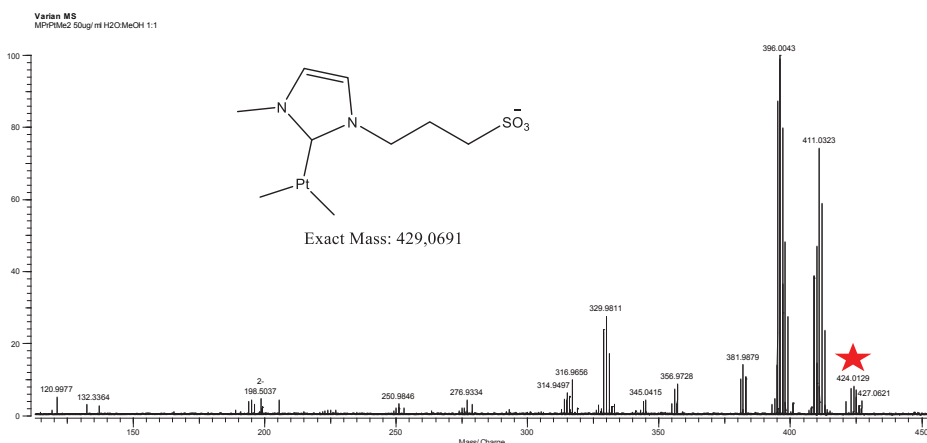


Figura 4. Espectro de fragmentación (IRMPD) del compuesto con platino MPrPtMe2. Se señala con una estrella roja el precursor remanente. El espectro fue adquirido en el FT-ICR de nuestro grupo como parte de un trabajo descrito en los resultados (apartado 4.2.4).

Entre las múltiples técnicas de fragmentación, algunas de las más destacables son: CID (*Collision-Induced Dissociation*), EI (*Electronic Impact*), IRMPD (*Infra Red Multi Photon Dissociation*), SORI-CID (*Sustained Off-Resonance Irradiation Collision-Induced Dissociation*) y ECD (*Electron Collision Dissociation*). Más adelante se describirá en detalle cada una de las técnicas de fragmentación asociadas a cada tipo de espectrómetro.

2.2.4 Guías n-polares

Una guía polar consiste en una serie de barras metálicas paralelas con distribución cilíndrica o hiperbólica (figura 5). Los iones que pasan a través de una de estas guías en funcionamiento se ven sometidos a un campo eléctrico oscilante de alta frecuencia que provoca un movimiento ondulatorio estable de los mismos. Este campo se crea mediante la aplicación directa sobre esos electrodos de la superposición de potenciales eléctricos oscilantes en el rango de radiofrecuencias (RF) a otro constante. La aplicación de este tipo de potenciales favorece la desestabilización selectiva de iones. Bajo estas condiciones, sólo los iones con una m/z específica o pertenecientes a un rango de m/z concreto pueden pasar a través de las guías n-polares. De esta manera, se le considera un sistema de pasa-alta o de pasa-baja más que un filtro de masas como tal. Estos dispositivos pueden ser, por tanto, empleados como filtros de masas o como simples guías para mover los iones hacia el detector.

Típicamente, las guías más habituales son las cuadrupolares, hexapolares, y octopolares, si bien existen n -polares en general. La diferencia básica es que a mayor número de polos en la guía, menor será la ventana óptica (zona axial de campo eléctrico nulo) por donde se mueven los iones en su interior.

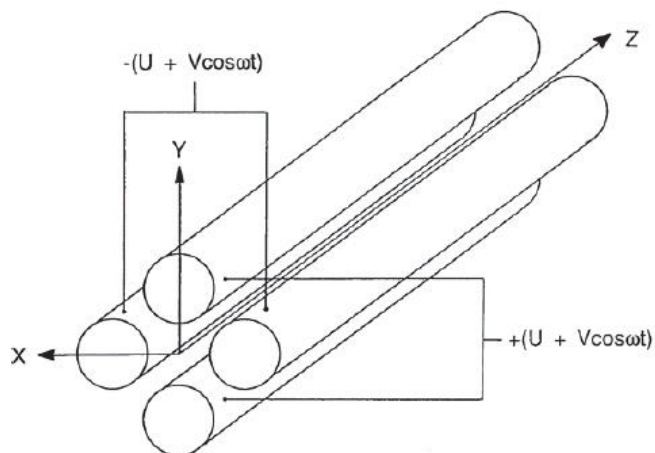


Figura 5. Vista en perspectiva de una guía cuadrupolar. Aquí se aprecia la aplicación de potenciales en paralelo.

Gracias a este sistema de filtrado, se incrementa notablemente la relación señal/ruido. Esta característica es la razón por la cual estos equipos son tan sensibles y tan ampliamente utilizados en la búsqueda de analitos concretos (*target mass spectrometry*) [34].

2.2.5 Espectrómetro de triple cuadrupolo

Los llamados espectrómetros de masas de triple cuadrupolo están formados por la sucesión de tres cuadrupolos sencillos y son, probablemente los más utilizados para la cuantificación de analitos. Si bien no son de alta resolución ni elevada precisión en la medida de m/z que puedan tener otros equipos, su alta sensibilidad y enorme reproducibilidad los convierte en los mejores equipos (y más baratos) capaces de hacer MS/MS. Debido a su configuración y características están especialmente diseñados para ser empleados acoplados a cromatógrafos de líquidos o de gases. Las ventajas de estos equipos sobre otros son: i) tienen alta transmisión de datos, ii) son compactos,

versátiles y a precios más moderados, iii) manejan bajos potenciales de aceleración y iv) adquisiciones de alta frecuencia dado que trabajan con barridos de potenciales eléctricos.

Los iones generados en la fuente de ionización deben pasar a través de las tres guías cuadrupolares antes de alcanzar el detector. Durante este trayecto, pueden ser filtrados en el primer cuadrupolo Q1 y acelerados mediante la aplicación de un potencial eléctrico en el segundo cuadrupolo Q2, el cual se inunda de un gas inerte como Ar o N₂. Los iones acelerados colisionan con los átomos o moléculas del gas en el Q2. Si las colisiones son suficientemente energéticas, se consideran colisiones eficaces, ya que los iones se fragmentan dando productos de menor tamaño. Los fragmentos cargados son guiados y/o filtrados a su vez por el tercer cuadrupolo Q3 y finalmente detectados (figura 6).

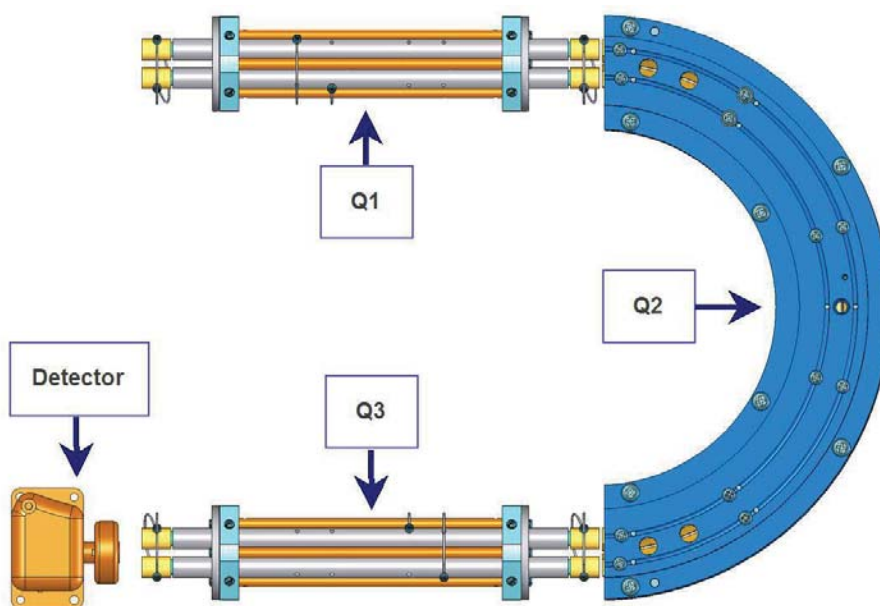


Figura 6. Dibujo de los componentes básicos de un triple cuadrupolo Varian 320-MS.

Estos equipos son muy versátiles a la hora de fragmentar, ya que mediante la combinación de sus cuadrupolos, se pueden diseñar diferentes tipos de experimentos MS/MS, a saber:

- *“Product Ion Scan”*: Se selecciona un ion en Q1, se fragmenta en Q2 y sus fragmentos son seleccionados en Q3 dentro del rango de masas deseado. Este modo aporta información estructural.
- *“Neutral Scan Loss”*: Se selecciona un rango de masas en Q1, se fragmenta en Q2 y se sincroniza Q3 para una pérdida constante de masa. Esto representa la pérdida de un fragmento neutro y ayuda a identificar compuestos con el mismo grupo funcional.
- *“Selected Reaction Monitoring or Selected Ion Monitoring”*: En Q1 se selecciona un ion específico y se fragmenta en Q2, seleccionando únicamente un fragmento específico en Q3.
- *“Multiple Reaction Monitoring”*: Similar al modo anterior pero con la capacidad de replicar el análisis en canales paralelos para iones diferentes.
- *“Precursor Scan”*: Se selecciona un rango de masas en Q1 (puede ser en varios canales simultáneamente) y se fragmentan los iones presentes en Q2; en Q3 únicamente se selecciona la masa del producto que debería formarse. Este modo nos da pistas acerca de la presencia de determinados analitos en función de los grupos funcionales perdidos.

Cualquier combinación de estos modos es posible dentro de un mismo método. En todos ellos, el sistema de fragmentación empleado es CID.

2.2.5.1 Disociación Inducida por Colisión (CID)

Con mucho, el medio de fragmentación más extensamente empleado para el análisis de moléculas orgánicas y biomoléculas es la disociación inducida por colisión o CID (*“Collision-Induced-Dissociation”*) o también conocido como CAD (*“Collision-Activated-Dissociation”*) [35, 36]. Esta técnica está compuesta de dos pasos: activación de los iones y disociación unimolecular de los mismos. Los iones son acelerados mediante campos eléctricos y/o magnéticos hasta alcanzar una determinada energía cinética. En un segundo paso, estos iones son obligados a colisionar con átomos de algún gas inerte como argón o nitrógeno. Durante la colisión, una buena parte de la energía traslacional del ion se convierte en energía de excitación. Esta produce una distribución de estados electrónicos excitados, cuyo exceso de energía es convertido

rápidamente a energía vibracional que se distribuye estadísticamente por todos los enlaces covalentes. En otras palabras, la colisión provoca un aumento de la energía interna del ion que, si se supera el umbral de disociación, se fragmentará pudiéndose analizar los productos formados en el analizador. Una característica destacable de esta técnica es que los productos formados tendrán una intensidad inversamente proporcional a la fortaleza del enlace roto.

2.2.5.2 Espectrómetro utilizado

El instrumento TQ utilizado en el transcurso de los experimentos es un espectrómetro Varian MS-320 dotado de fuente de ionización ESI. El flujo de iones generado puede ser conducido hasta un detector de impacto o pasar hacia un FT-ICR acoplado en serie. El rango detectable mediante este dispositivo está entre 10 y 2000 m/z, con una resolución ligeramente inferior a 1 Da.

2.2.6 FT-ICR

FT-ICR (*“Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance”*) o Resonancia Ciclotrónica de Iones con Transformada de Fourier es una técnica de espectrometría de masas de alta resolución y sensibilidad; basada en el confinamiento de los iones cuyo movimiento se produce por efecto de un campo magnético intenso.

El desarrollo de la técnica de masas tal y como la conocemos hoy día comenzó en el año 1932 cuando E. O. Lawrence aplicó un campo eléctrico ortogonal a un campo magnético para construir un acelerador de partículas [16]. Se demostró (ec. 5) que la frecuencia ciclotrónica de iones es independiente del radio de giro.

2.2.6.1 Fundamentos

Una carga eléctrica (z) que se desplaza con velocidad (\vec{v}) en una zona donde existe un campo magnético (\vec{B}) se ve sometida a la acción de una fuerza de desviación denominada Fuerza de Lorentz:

$$\vec{F}_B = z\vec{v} \times \vec{B} \quad (2)$$

Asumiendo la ausencia de campo eléctrico ($E=0$) y fijando el eje Z como eje director del campo magnético, se concluye que los iones se mueven describiendo trayectorias helicoidales a lo largo del eje Z con una aceleración centrípeta (en el plano XY) igual a v_{xy}^2/r .

$$m \frac{v_{xy}^2}{r} = q v_{xy} B \quad (3)$$

Donde el módulo de esta componente de velocidad lineal viene a ser:

$$v_{xy} = \sqrt{v_x^2 + v_y^2} \quad (4)$$

Si definimos la velocidad angular de rotación como $\omega_{xy} = v_{xy}/r$ y la sustituimos en la ecuación 3, obtenemos:

$$\omega_{xy} = \frac{qB}{m} \quad (5)$$

Denominándose a ω_{xy} como frecuencia ciclotrónica. Esta última ecuación es la que rige el comportamiento de una partícula cargada dentro de un FT-ICR, dependiendo la frecuencia solamente de la relación m/z del ion y del campo magnético [37].

2.2.6.2 Celda de confinamiento de iones

La celda de confinamiento es una de las partes más importantes de esta técnica. En ella se confinan, excitan y detectan los iones. Está compuesta por cuatro tipos de placas con una geometría cúbica, cilíndrica o hiperbólica. A estas placas se les aplica potenciales eléctricos de diferentes magnitudes para llevar a cabo las funciones anteriormente citadas.

- i) *“Trapping quad”*: cuando los iones llegan a ella desde la guía n -polar, deben atravesar la primera placa, así denominada. Se encuentra sometida a un potencial distinto de cero y únicamente se anula una vez que los iones pasan a su través.
- ii) *“Trapping filament”*: para que los iones no atravesen libremente la celda debido a la inercia que llevan asociada, en el lado opuesto a la primera, se sitúa el *“trapping filament”*, placa gemela a la anterior.

- iii) *Celdas de excitación y detección*: son 2 pares de placas axiales al campo magnético y paralelas entre sí que envuelven a las anteriores. A través de las placas de excitación se emiten pulsos de radiofrecuencia que suministran energía traslacional a los iones para que puedan incrementar sus radios de giro hasta poder inducir señales de carga a su paso cerca de las placas de detección.
- iv) *“Inner rings”*: son la última pieza fundamental de que se compone una celda de FT-ICR. Rodean la celda y tienen la labor de mantener los iones lo menos dispersos posible a lo largo de la órbita de giro para aumentar la sensibilidad.

El potencial de confinamiento V_{xyz} que se aplica entre las placas “trapping” es:

$$V_{xyz} = V_T \left[k + \frac{\alpha}{2a^2} (2Z^2 - X^2 - Y^2) \right] \quad (6)$$

Expresado en coordenadas cilíndricas, con radio r :

$$V_{r,z} = V_T \left[k + \frac{\alpha}{2a^2} (2Z^2 - r^2) \right] \quad (7)$$

Donde $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ es la posición radial del ion en el plano XY, a es una medida del tamaño de la celda, k y α son constantes que dependen de su geometría y V_T es un voltaje de referencia. Al aplicar el potencial de confinamiento a los iones en la celda, estos sufren una fuerza de perturbación adicional a la fuerza creada por el campo magnético. Esta fuerza, orientada a lo largo del eje Z, es del tipo oscilador armónico:

$$F_z = \frac{\omega_z}{2\pi} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{2qV_T\alpha}{ma^2}} \quad (8)$$

También debe tenerse en cuenta la fuerza de perturbación radial, opuesta a la fuerza creada por el campo magnético:

$$F_p(r) = -q \frac{\partial}{\partial r} V(r, z) = \left(\frac{qV_T\alpha}{a^2} \right) r \quad (9)$$

De la combinación de las ecuaciones 5 y 8 surge:

$$\omega^2 - \frac{qB\omega}{m} + \frac{qV_T\alpha}{ma^2} = 0 \quad (10)$$

Como se puede apreciar la ecuación anterior es una ecuación de segundo grado con ω como variable. La solución a esta ecuación deja dos resultados cuyo significado es la existencia de dos movimientos rotacionales con frecuencias:

$$\omega_+ = \frac{\omega_c}{2} + \sqrt{\left[\left(\frac{\omega_c}{2}\right)^2 - \frac{\omega_z^2}{2}\right]} \quad (11)$$

$$\omega_m = \frac{\omega_c}{2} - \sqrt{\left[\left(\frac{\omega_c}{2}\right)^2 - \frac{\omega_z^2}{2}\right]} \quad (12)$$

Estas dos frecuencias son denominadas frecuencia angular ciclotrónica rápida (ω_+) y frecuencia angular magnetrónica (ω_m). A partir de este desarrollo se concluye que existen cuatro tipos de movimientos dentro de la celda de FT-ICR: ω o movimiento ciclotrónico fundamental, ω_z o movimiento armónico con oscilación a lo largo del eje z, y otros dos, ω_+ movimiento rápido y ω_m movimiento magnetrónico, en el plano XY. Si bien los movimientos derivados del confinamiento son sensiblemente menos intensos que el movimiento ciclotrónico, los potenciales de las placas que los producen se reducen a cero una vez confinados los iones con la idea de minimizar al máximo las perturbaciones durante la detección.

2.2.6.4 Excitación

Cuando un paquete iónico es transportado hasta el corazón de un campo magnético, el resultado será básicamente un movimiento circular perpendicular a dicho campo siguiendo siempre la Ley de Lorentz. No obstante, el radio de la órbita de giro no es lo suficientemente grande por sí mismo para generar una señal inducida en las placas de detección. Para solucionar esto se aplican pulsos de radiofrecuencia (RF), a través de las placas de excitación, en el rango de frecuencias ciclotrónicas (ω). Esto provoca un aumento en la energía cinética de los iones afectados, alcanzando una órbita de giro mayor. Si bien el radio de giro aumenta, y también la velocidad lineal de los iones dentro de la celda, la frecuencia ciclotrónica permanece constante:

$$r = \frac{E_0 t_{exc}}{2B_0} \quad (13)$$

Siendo t_{exc} el tiempo de irradiación de la RF y E_0 el módulo del campo eléctrico de la misma. A partir de la ecuación 13 se puede concluir lo siguiente:

- El radio de la órbita que describe el ion crece linealmente con el tiempo y es independiente de las condiciones .

- El radio de la órbita de los iones excitados es independiente de su relación m/z .

- Es posible sobreexcitar selectivamente un ion o rango de iones de una determinada m/z aplicando un pulso de RF que lo expulse de la celda. Esto permite eliminar o aislar un ionen particular de la celda de trabajo.

2.2.6.5 Detección

Un experimento de FT-ICR requiere una separación total en el tiempo entre los eventos de excitación de los iones y su detección. La detección está basada en las señales eléctricas que los iones inducen cuando pasan cerca de las placas de detección. Esta corriente eléctrica oscilante es inducida por cada paquete de iones cuando pasan repetidamente sobre estas placas, generando una señal en el dominio del tiempo cuya frecuencia es idéntica a la frecuencia ciclotrónica del paquete de iones que la ha generado. Una vez adquirida esta señal, se aplica la transformada de Fourier para convertirla al dominio de las frecuencias (figura 7).

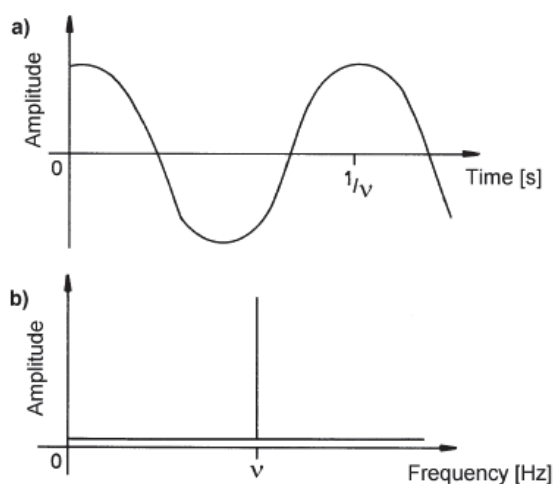


Figura 7. a) Representación de una onda producida por la detección de un ion en el dominio del tiempo.
b) El mismo valor transformado al dominio de la frecuencia.

Al ser la frecuencia de giro directamente proporcional a la relación m/z como ya se ha visto, sólo faltaría transformar el valor de la frecuencia en Hz a valor de masa o m/z .

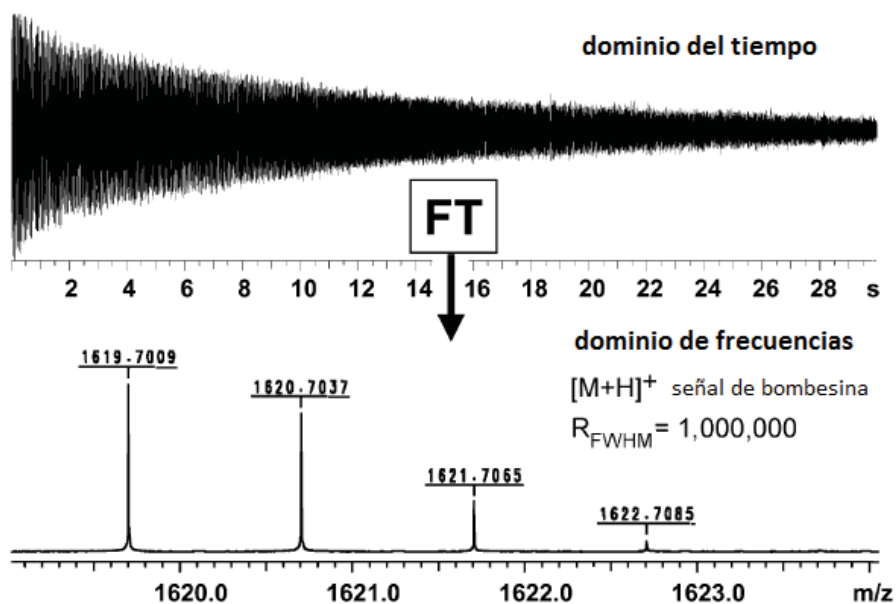


Figura 8. Principio del FT-ICR-MS. Arriba se muestra el *transient* en el dominio del tiempo y abajo la señal ya convertida al dominio de la frecuencia (m/z) tras ser aplicada la transformada de Fourier.

Si el vacío dentro de la celda es lo suficientemente alto ($\sim 10^{-10}$ mbar) los iones pueden estar girando e induciendo la corriente que permite detectarlos durante segundos (figura 8). El poder retener iones durante largos períodos de detección en el interior de la celda, así como la posibilidad de aislar o eliminarlos selectivamente mediante pulsos de radiofrecuencia es lo que confiere a este tipo de instrumentos sus extraordinarias cualidades de alta resolución y elevada sensibilidad.

2.2.6.6 Características

Resolución

La resolución (R) de un instrumento de MS se define como la relación entre la posición central de un pico del espectro correspondiente a una m/z (m) respecto al ancho del mismo a la mitad de su altura máxima (Δm) (figura 9).

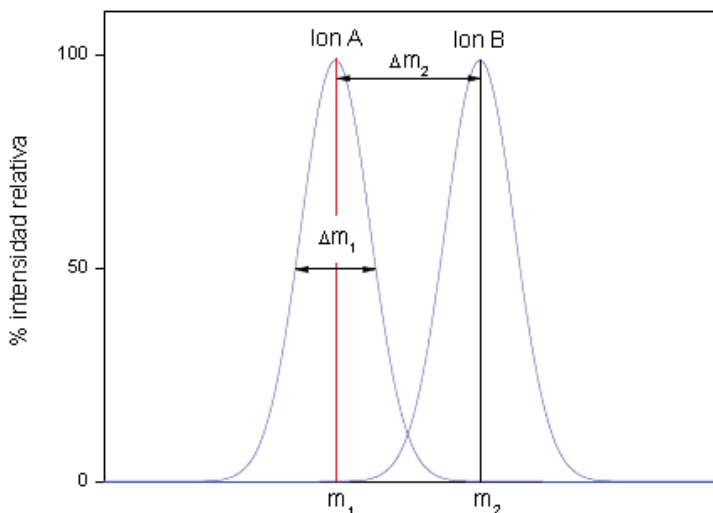


Figura 9. Representación gráfica de la resolución espectral entre dos picos en MS.

En FT-ICR la resolución también puede expresarse en términos de frecuencia y campo magnético:

$$R = \frac{\omega_i}{\Delta\omega_i} = -\frac{m}{\Delta m} = \frac{qB_0}{m\Delta\omega} \quad (14)$$

De esta expresión se deriva que la resolución de un FT-ICR depende directamente de la intensidad del campo magnético. Los FT-ICR, particularmente los que operan con campos magnéticos intensos (mayores de 7T) son los equipos con mayor resolución [37], incluso para aquellas especies con alto valor de m/z (figura 8), en el campo de la espectrometría de masas.

Precisión

La precisión se define en química analítica como la diferencia entre el valor medido y el valor real. En espectrometría de masas es común la utilización de ppm o partes por millón para dar el valor de la desviación en una medida respecto a su valor real.

$$ppm = \frac{(masa\ real - masa\ medida)}{masa\ real} \times 10^6 \quad (15)$$

Con calibrados internos es posible alcanzar errores no mayores a 0.5 ppm en un FT-ICR [38].

Límite de detección

El límite de detección se establece como la señal mínima detectable por un instrumento. Se ha acordado por convenio internacional un valor igual a tres veces la desviación estándar del blanco o ruido. En MS, el límite de detección se establece como el mínimo número de iones necesarios para obtener una señal mensurable en un periodo de adquisición de datos de 1 segundo y con una relación señal/ruido (sensitividad) de 3:1 [37]. Puede calcularse a través de la siguiente ecuación:

$$N_{min} = \frac{CV_{d(p-p)}}{qA_1(r)} \quad (16)$$

Donde C es la capacitancia del circuito de detección, $V_{d(p-p)}$ la amplitud de pico a pico del voltaje detectado y $A_1(r)$ es un coeficiente proporcional al radio de giro del ion resonante. Teniendo en cuenta los valores de operación típicos ($C = 50$ pF, $V_{d(p-p)} = 3 \times 10^{-7}$ V y $A_1(r) = 0.5$) el límite de detección es $N_{min} \approx 187$ iones. Es posible obtener espectros de FT-ICR de buena calidad con 103 a 104 iones, es decir, con cantidades de muestra en el rango de pmol-fmol e incluso attmol [39].

2.2.6.7 Sistemas de Fragmentación en FT-ICR

La geometría de la celda de confinamiento así como la del equipo completo hacen que los iones encerrados en su interior puedan ser sometidos a diferentes métodos de fragmentación. Cada una de ellas tiene propiedades diferentes, aportando matices distintos a la hora de romper una molécula. Por ejemplo, IRMPD fragmenta muy bien los enlaces O-P presentes en las fosforilaciones de algunos residuos peptídicos, mientras que ECD fragmenta el mismo péptido con otro patrón, conservando esa modificación postraducional.

2.2.6.7.1 SORI-CID

Los espectrómetros FT-ICR cuentan normalmente con entradas de gas al analizador que entre otras funciones pueden ser utilizadas para realizar experimentos de CID. La entrada de gas a la celda podría comprometer el ultra alto vacío, por lo que esto se lleva a cabo mediante válvulas pulsadas que permanecen abiertas entre 5 y 50 ms. Para conservar la sensibilidad y resolución de estos equipos, existe un tiempo de enfriamiento para los iones fragmentados desde la introducción del gas y su detección. Durante estos segundos, las bombas turbomoleculares desalojan el gas que haya entrado durante el proceso. Aunque la mera adición de un gas inerte puede inducir la disociación debido a la energía cinética propia de los iones en el interior de la celda, en general, suele ser necesario aumentar dicha energía para obtener una fragmentación eficaz. Para ello se utiliza un pulso de radiofrecuencia denominado SORI (*Sustained Off-Resonance Irradiation*). El pulso SORI consiste básicamente en pulsos de RF en resonancia y fuera de resonancia con una frecuencia cercana a la ω_c del ion a excitar. Como consecuencia, el ion afectado es acelerado y desacelerado repetidamente. De esta forma se consigue incrementar la energía cinética del ion evitando una sobreexcitación que provocaría su expulsión de la celda. En la práctica, el ion de interés es aislado para asegurar que los posibles fragmentos formados procedan exclusivamente de él, se aplica el pulso SORI con una determinada intensidad y simultáneamente se abre la válvula del gas de colisión.

Un detalle a tener en consideración cuando se fragmenta con SORI-CID es que se trata de una técnica altamente selectiva a la m/z de ion, y por tanto activa solamente

el ion precursor, incluso sólo un isótopo. Como resultado, se debe tener especial cuidado en la configuración del equipo para conservar el perfil isotópico en los productos. Además, esta alta selectividad, hace que se disocie únicamente el precursor y no así sus productos, los cuales no reciben ninguna energía adicional para producir fragmentos de segunda generación.

2.2.6.7.2 Disociación por radiación Infrarroja Multifotónica

La técnica conocida como IRMPD (*Infra-Red Multi-Photon Dissociation*) se basa en la irradiación de los iones mediante un láser de infrarrojo [40]. La diferencia con CID es que aquí la excitación molecular se produce por absorción de fotones en lugar de colisiones moleculares. Sin embargo, ambas técnicas son ergódicas (existe una redistribución de la energía entre los modos vibracionales del ion ya que la tasa de disociación es más lenta que la tasa de distribución aleatoria de energías), generando por tanto patrones de disociación similares [41]. Esta técnica fue descrita por primera vez en 1978 por Woodin [42] para la disociación de dietiléter. Está especialmente diseñada para modelos de espectrómetros trampa como un ICR, donde los iones son retenidos dentro de la celda mientras el haz de fotones impacta contra ellos. Para ello es necesaria una ventana de un material transparente a IR como BaF_2 o ZnSe . Los pulsos de láser disparados suelen ser de entre 5 y 300 ms.

Existen una serie de ventajas de esta técnica sobre CID o SORI-CID:

- Mejora de la sensibilidad: La fragmentación CID implica la introducción de un gas de colisión en la celda o en el dispositivo cuadrupolar de fragmentación; además si es SORI la excitación previa de los iones, puede ocasionar una disminución de la señal detectada debido a la expulsión de una parte considerable de iones. Sin embargo, con IRMPD, no es necesario ninguno de estos pasos y la detección iónica depende más bien de la eficacia del detector.
- Mejora en el rendimiento de la fragmentación: Cuando en un FTICR se utiliza SORI-CID como técnica de fragmentación, el ion seleccionado es excitado cinéticamente y sometido a colisión con gas. De esta manera los iones generados como productos ven disminuida su energía interna notablemente y por consiguiente no alcanzan un choque eficaz. Por otro lado, cuando es el láser el

elegido para romper los iones, existe la posibilidad de irradiar también los fragmentos dado que los pulsos son típicamente mucho más largos que el fenómeno de activación-fragmentación. Esto es especialmente útil a la hora de trabajar con biomoléculas de gran tamaño.

- Aumento en el rango de masa: Con CID la energía de la colisión se reparte aleatoriamente sobre todos los enlaces. Si la molécula tiene un tamaño muy grande, los grados de libertad asociados a ella crecen exponencialmente. Así pues la energía se reparte entre un mayor número de enlaces llegando a desactivarse vibracionalmente la excitación sin provocar ninguna pérdida.

Por otra parte, no todo son ventajas, el manejo de un láser implica algunos inconvenientes tales como:

- La radiación del láser puede ser peligrosa y que entraña riesgos laborales.
- Si bien es posible acoplarlo a una trampa iónica, el mayor rendimiento de esta herramienta se alcanza combinándola con un FTICR o un Orbitrap, equipos ambos de gran costo para cualquier laboratorio.
- Por último, y no menos importante, la longitud de onda del láser suele estar fijada en 10.6 μm , de forma que si una molécula tiene su máximo de absorción lejos no se fragmentará por acción de la radiación.

2.2.6.8 Espectrómetros utilizados

El instrumento utilizado para llevar a cabo los experimentos durante la tesis ha sido un FT-ICR Varian 920/30-MS con fuentes externas ESI y MALDI (láser Nd:YAG 355nm) cuyo imán superconductor (Nb/Ti, de ciclo cerrado de He- líquido) genera un campo magnético de 7.0T. Dispone de hexapolos de acumulación iónica y guías hexapolares, válvulas pulsadas para la realización de experimentos SORI/CID, sistema de fragmentación IRMPD, medidores de vacío tipo Bayard-Alpert, bombas turbomoleculares (y una criogénica en el módulo ESI) en serie para la cámara de trabajo de ultra-alto vacío (10^{-9} - 10^{-11} mbar). El módulo ESI está acoplado al TQ descrito anteriormente.



Figura 10. Imágenes de los espectrómetros de masas situados en nuestro laboratorio del Instituto de Química-Física “Rocasolano”. A la izquierda una fotografía del triple cuadrupolo con fuente ESI. A la derecha imagen del imán con el módulo MALDI detrás.

2.2.7 Espectrometría iPEPICO

PEPICO (Photo-Electron Photo-IonCoincidence), es una espectrometría basada en la fotoionización de moléculas y posterior registro sincronizado o “coincidente” de electrones (con energía cinética inicial nula) e iones. Los iones se analizan mediante un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF). Los experimentos más comunes con PEPICO están relacionados con la disociación unimolecular de iones y la información obtenida de los correspondientes datos son básicamente: constantes de velocidad de disociación y energías traslacionales liberadas.

Estas magnitudes se determinan previo tratamiento y análisis intensivo de datos experimentales mediante cálculos mecanocuánticos y la teoría estadística RRKM. PEPICO permite dilucidar tanto los mecanismos de disociación como la termoquímica de las diversas rutas de fragmentación de un proceso iónico. Las magnitudes energéticas (p.ejem. calores de formación de especies neutras e iónicas) determinadas pueden llegar a tener una precisión del orden de unos pocos kJ/mol.

Brehm y von Puttkammer publicaron el primer artículo sobre PEPICO en el año 1967 [43]. En los primeros trabajos empleaban una fuente de luz fija y los electrones eran detectados con detectores hemisféricos. Posteriormente se utilizó lámparas de luz de intensidad regulable, donde la mayor parte de los electrones detectados eran electrones con energía cinética inicial cero. Así pues los espectros de masas son generados como función directa de la energía del fotón. Inicialmente la detección de los electrones umbral o con energía inicial cero, estaba basada en el desvío de aquellos

con exceso de energía cinética por medio de un campo eléctrico positivo aplicado por pequeños polos. Este método tenía el inconveniente de ser poco sensible, necesitando largos períodos de tiempo para realizar un experimento. El compromiso necesario entre resolución y sensibilidad se resolvió aplicando mapas de velocidad sobre un detector y disponiendo una imagen del mismo.

De esta forma es como nació el i-PEPICO (figura 11), a partir del t-PEPICO (*threshold Photo-Electron Photo-Ion Coincidence*) precursor del actual.

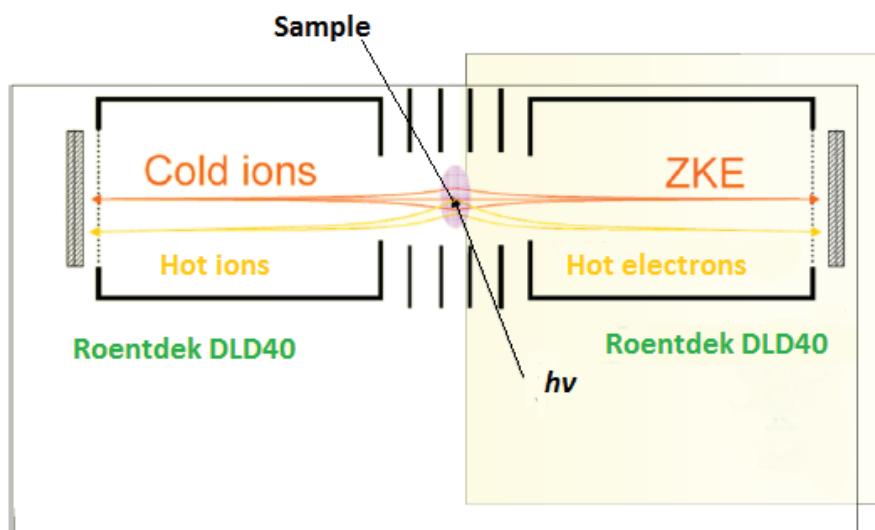


Figura 11. Esquema del espectrómetro iPEPICO situado en el sincrotrón Swiss Light Source de Suiza.

2.2.7.1 Fotoionización

La fotoionización está basada en la irradiación de una molécula por radiación con luz, generalmente del espectro UV. Un haz de fotones provenientes de un láser, una lámpara de hidrógeno o de un Sincrotrón es quien emite estos fotones que colisionan con la molécula neutra arrancándole un electrón. De esta manera se generan iones moleculares con carga positiva:



Esta es la técnica que se utiliza para ionizar en experimentos de iPEPICO. Gracias a su especial exactitud en el valor de energía, está especialmente indicada para la determinación de potenciales de ionización así como umbrales de fragmentación.

2.2.7.2 Fundamentos

Para poder determinar con precisión la energía de disociación de una especiemolecular es necesario conocer el estado energético en el que se encuentra. Por ello es fundamental contar con fuentes de ionización que generen las partículas cargadas en estados energéticos determinados; en este contexto, las fuentes de fotoionización UV permiten ajustar con precisión la energía suministrada a la molécula. Pese a ello, por muy precisa que sea la fuente, la energía absorbida durante la ionización de la molécula (A) se reparte entre la energía interna (E_{int}) del ion recién formado (A^+) y la energía cinética (KE) del electrón arrancado en el proceso:

$$A + h\nu \rightarrow A^+(E_{int}) + e^-(KE) - IE \quad (18)$$

Donde IE es la energía de ionización de la molécula A. Por lo tanto, en el proceso de ionización, se formarán tantos iones con una distribución de energías internas determinadas como electrones con su distribución de energías cinéticas. El principio del iPEPICO consiste en registrar sólo aquellos iones coincidentes con electrones de una KE determinada, en concreto para aquellos electrones con KE inicial nula y por lo tanto E_{int} máxima.

Si el pulso de ionización aplicado es suficientemente energético se producirá, además, la disociación de la molécula:

$$AB + h\nu \rightarrow A^+ + B + e^- \quad (19)$$

Variando de forma controlada la energía aplicada ($h\nu$) y con el correspondiente tratamiento y análisis de los datos experimentales mediante cálculos mecanocuánticos y la teoría RRKM. Esta energía de disociación a 0 K (onset E_0) puede ser relacionada con la entalpía de la reacción ΔH_{0K}^0 definida en la ecuación 20 como:

$$E_0 = \Delta H_{0K}^0 = \Delta_f H_{0K}^0(A^+) + \Delta_f H_{0K}^0(B) - \Delta_f H_{0K}^0(AB) \quad (20)$$

Donde las $\Delta_f H_{0K}^o$ son entalpías de formación a 0K. De esta manera, podemos determinar la entalpía de formación $\Delta_f H_{0K}^o$ de una de las especies conociendo la de las otras dos.

2.2.7.3 Funcionamiento

En iPEPICO (figura 11) la muestra es introducida por vaporización en una cámara donde interacciona con los fotones energéticamente seleccionados de la fuente UV. En los instrumentos conectados a líneas VUV (vacuum ultraviolet) de radiación sincrotrón, la luz ionizante, de gran intensidad (10^{12} fotones/s), está monocromada y posee una precisión de ± 0.0001 eV. Un campo eléctrico extrae los cationes radicales formados y sus correspondientes electrones en direcciones opuestas siendo detectados por separado. El electrón impacta en un detector con resolución espacial, activando el cronómetro que mide el tiempo de vuelo de su catión correspondiente.

La resolución espacial del detector de electrones es fundamental para distinguir aquellos electrones con KE inicial nula que impactarán en el centro del detector. Los electrones con KE distintas a cero (y por lo tanto correspondientes a cationes de energías internas no máximas), llamados “*hot electrons*” o electrones excitados, impactarán en diferentes zonas del detector.

A nivel práctico se define una zona anular alrededor del centro del detector para medir la densidad de impactos de electrones excitados. Después, se sustrae esta aportación a la señal obtenida en el centro del detector. Para cada energía suministrada, se registra el espectro de intensidades frente a m/z de los cationes detectados y coincidentes con los electrones resultantes de la sustracción descrita anteriormente. De esta manera, se hace el seguimiento preciso del proceso de disociación molecular estudiado.

2.2.7.4 Espectrómetro empleado

El espectrómetro iPEPICO utilizado en el transcurso de la investigación se encuentra en la línea de radiación VUV del sincrotrón ubicado en el Instituto Paul Scherrer de Villigen, Suiza. Se trata de un sincrotrón de tercera generación en el que

los electrones circulan en una circunferencia de 288 metros con energías de hasta 2.4 GeV. Incluye 18 estaciones de trabajo.

La estación o línea VUV utilizada trabaja en el rango de 3-15 eV. Los detalles técnicos del instrumento han sido descritos con anterioridad por Andras Böedi [44].

2.2.8 Trampa Iónica Cuadrupolar (QIT)

Los tipos de trampas iónicas presentes en el mercado son: *Linear ion trap* y *Quadrupole Ion Trap*. La primera está formada por una cuadrupolo lineal, semejante al descrito en el apartado 2.2.4, con la diferencia de que en este caso existen potenciales eléctricos a la entrada y a la salida de la guía polar que la convierten en una trampa para iones. En contraste con la trampa lineal, la trampa tridimensional diseñada por Wolfgang Paul genera un pulso de radiofrecuencias mediante un cuadrupolo con simetría esférica que almacena los iones dentro de sus límites. Ya que este es el tipo de trampa empleado por el doctorando durante su trabajo, será esta la que se describa detalladamente.

Aunque la invención de tal equipo es del año 1953 [45], no fue hasta la década de los 80 cuando se estableció como herramienta analítica [46]. Las trampas modernas cubren rangos de m/z hasta los 3000 u.m.a. y pueden ser empleados tanto acoplados a equipos de GC como de LC gracias a las interfaces actuales. Tienen una velocidad de adquisición mucho más alta que otras trampas como FT-ICR, sin embargo, se hace a costa de sacrificar precisión y resolución en los resultados. Al igual que otros tipos de trampas, es capaz de realizar MS^n .

2.2.8.1 Fundamentos

Un QIT consta de dos electrodos hiperbólicos junto con un electrodo anular que rodea a los dos anteriores (figura 12).

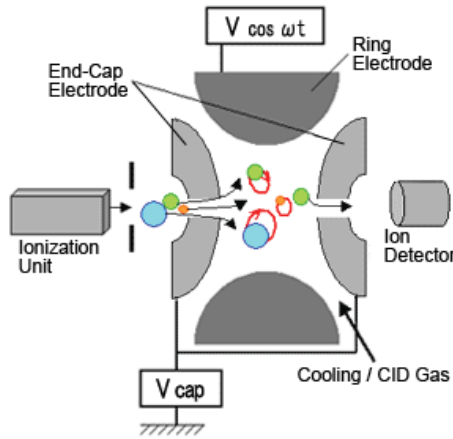


Figura 12. Corte transversal de la celda de una trampa iónica cuadrupolar.

Típicamente, el ángulo del que constan los electrodos rodeados por el anillo (llamados *end-cap electrodes*) es de 70,5°. Ambos electrodos están eléctricamente conectados, aplicando el potencial eléctrico entre ellos y el electrodo anular. El fundamento en el que está basado este tipo de instrumento está basado en la creación de trayectorias estables para los iones de una cierta m/z o rango de m/z expulsando los iones indeseados haciéndolos colisionar con las paredes de la trampa o mediante eyección axial de la celda.

Para las QIT, el campo aplicado es tridimensional. Φ_0 es el potencial que se aplica al electrodo anular. La coordenada axial donde están los iones en la trampa se denomina con la letra z , mientras que z_0 es el valor que define el centro geométrico de la trampa. El plano xy está definido en la celda por el radio r_0 , siendo r la posición radial del ion. Con el potencial del end-cap llevado a cero (referencia), el potencial que domina el movimiento, selección y expulsión de los iones resulta como sigue:

$$\Phi_0 = U + V + \cos\Omega t \quad (21)$$

Donde $\Omega = 2\pi f$, y f la frecuencia fundamental de la trampa iónica, típicamente del orden de 1MHz. Si escribimos la ecuación 21 en coordenadas cilíndricas (usando las transformaciones estándar: $r = \cos \vartheta$, $y = \sin \vartheta$, $z = z$) queda como sigue:

$$\Phi_{x,y,z} = \frac{\Phi_0}{r_0^2} (r^2 \cos^2 \theta + r^2 \sin^2 \theta - 2z^2) \quad (22)$$

Simplificando reduce a:

$$\Phi_{r,z} = \frac{\Phi_0}{r_0^2} (r^2 - 2z^2) \quad (23)$$

2.2.8.2 Espectrómetro empleado

Para la realización de los experimentos descritos en el apartado 4.4 se empleó una trampa iónica cuadrupolar (QIT) (Bruker Daltonics HCT Ultra, Bremen, Alemania) con fuente de ionización externa ESI. El equipo permite trabajar en un rango de m/z de 100 a 3000 u.m.a. en full scan.

3. MÉTODOS COMPUTACIONALES

La química teórica y computacional se encarga de explorar un amplio abanico de fenómenos químicos (de sistemas atómicos y moleculares) utilizando tratamientos tanto clásicos como cuánticos y el concurso decisivo de ordenadores sobre todo en la resolución de complejas ecuaciones mecano-cuánticas.

Gracias a la alta capacidad de cálculo de los ordenadores basada en la velocidad de procesamiento, la determinación de una estructura molecular de tamaño considerable así como de sus propiedades físico-químicas asociadas se ha convertido en una tarea relativamente rápida y sencilla. Por otra parte, la cada vez mejor capacidad gráfica de estos ordenadores nos permite visualizar moléculas de gran tamaño en su configuración óptima.

Los modelos empleados en la química computacional se dividen fundamentalmente en dos categorías: modelos de mecánica molecular y de mecánica cuántica (o teoría de la estructura electrónica). A lo largo de este capítulo se describen algunos aspectos generales de ambos modelos.

3.1 Mecánica Molecular

Los modelos de mecánica molecular están basados en la mecánica newtoniana, en la cual se representa cada átomo de la estructura molecular como una esfera sólida. En este tipo de modelos, las posiciones de los átomos en las moléculas se ajustan según datos experimentales conocidos. Para determinar energías de torsión y flexión se emplean expresiones de oscilador armónico. Para incluir energías asociadas a interacciones atómicas entre átomos no enlazantes, se utilizan funciones de potencial para partículas discretas. Para todos los demás posibles movimientos e interacciones como son por ejemplo rotaciones o vibraciones se pueden incluir términos adicionales basados así mismo en la mecánica clásica.

Si bien estos métodos no son tan precisos como aquellos que emplean teorías de estructura electrónica para la determinación de estructuras y sus propiedades

asociadas, son ideales para esta tarea en sistemas moleculares complejos, como por ejemplo: estructura de centros activos en enzimas, modelado de superficies, etc. [47-49].

3.2 Teoría de la Estructura Electrónica

Aunque la computación basada en modelos clásicos o de mecánica molecular está muy bien para explicar el comportamiento de macromoléculas y para resolver somera y rápidamente problemas con otras más pequeñas, a menudo se hace necesaria la presencia de una metodología más precisa. Para tal fin existen las teorías de estructura electrónica, basadas en la mecánica cuántica. La ecuación principal que rige la mecánica cuántica es la ecuación de Schrödinger, que en su versión independiente del tiempo, queda expresada como sigue:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (24)$$

\hat{H} es el operador hamiltoniano, Ψ la función de onda del sistema y E los autovalores o valores propios de la ecuación. El operador hamiltoniano se desarrolla según la expresión:

$$\hat{H} = -\sum_i \frac{\nabla_i^2}{2} - \sum_A \frac{1}{M_A} \frac{\nabla_A^2}{2} - \sum_A \sum_i \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{A<B} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + \sum_{i<j} \frac{1}{r_{ij}} = T_e + T_N + V_{e-N} + V_{N-N} + V_{e-e} \quad (25)$$

Donde i y j son índices correspondientes a los electrones, A y B a los núcleos, Z es la carga electrónica, r y R las distancias interelectrónicas e internucleares, respectivamente, T_e y T_N representan las energías cinéticas de los electrones y los núcleos respectivamente, y V_{e-N} , V_{N-N} y V_{e-e} las interacciones electrón-núcleo, núcleo-núcleo y electrón-electrón respectivamente.

3.2.1 Aproximación de Born-Oppenheimer: superficies de energía potencial

La resolución analítica de la ecuación Schrödinger solamente es posible para el caso del átomo de hidrógeno, o los monoelectrónicos (hidrogenoides), en todos los demás casos las soluciones son aproximadas. Cuando la complejidad del átomo aumenta o coexisten varios átomos para formar una molécula, es necesario simplificar

el sistema. La aproximación de Born-Oppenheimer es la primera y más importante de ellas. Separa el movimiento de núcleos y electrones, y se basa en la gran diferencia de masa entre ambos. Dado que los núcleos son mucho más pesados que los electrones, su movimiento es mucho más lento, pudiéndose decir que los primeros están parados y son los electrones los que se mueven a su alrededor, en presencia del campo creado por los núcleos.

Según esto, el término que corresponde a la energía cinética nuclear puede despreciarse y tomar la repulsión nuclear como constante, simplificándose la expresión del correspondiente hamiltoniano:

$$\hat{H} = T_e + T_N + V_{e-N} + V_{e-e} \quad (26)$$

Así pues el hamiltoniano sólo describe el movimiento de los electrones en un campo de N cargas puntuales y fijas. La solución a la ecuación de Schrödinger con esta expresión sería:

$$\Psi_e = \Psi_e(\{r_i\}; \{R_A\}) \quad (27)$$

Esta depende exclusivamente de las coordenadas electrónicas r_i y paramétricamente de las coordenadas nucleares R_A . Así mismo, los autovalores se deducen de la siguiente expresión:

$$E_e = E(\{R_A\}) \quad (28)$$

El mismo razonamiento es aplicable al problema nuclear. Dado que la velocidad con la que se mueven los núcleos es mucho menor que la de los electrones, es razonable valorar la posibilidad de sustituir la velocidad electrónica en la ecuación 25 por su valor promedio, resultando el hamiltoniano nuclear:

$$\hat{H}_N = T_N + E_e(\{R_A\}) + V_{N-N} \quad (29)$$

De los tres términos, los dos últimos representan lo que se conoce como potencial efectivo, siendo la región por donde se desplazan los núcleos. Esta idea es la que se conoce como superficie de energía potencial (SEP), una función que describe el

cambio de energía potencial del sistema con el movimiento nuclear. La solución del hamiltoniano nuclear describe la vibración, rotación y traslación de una molécula.

3.2.2 Puntos Críticos

Los SEP son de vital importancia a la hora de describir los posibles mecanismos de reacción así como las estructuras más favorables asociadas a los mismos. La topología de estas superficies de potencial determina por qué vía será más propicio el acercamiento de reactivos y la formación de enlaces atendiendo siempre a la energía involucrada en ese proceso. Dicho de otra forma, el estudio de la SEP de un conjunto de moléculas nos dará información de la coordenada de reacción.

Basándonos en la premisa de que a un estado de mínima energía le corresponde la máxima estabilidad química, cuando una molécula está en su estado de equilibrio se dice que está en un mínimo de energía. Según esto, cualquier movimiento a través de la SEP requiere un aumento de energía. Sin embargo, dentro del mismo sistema pueden coexistir dos o más mínimos relativos, que corresponde a las diferentes conformaciones moleculares. Para que el sistema cambie de un mínimo a otro (superior o inferior) ha de pasar por una zona donde la energía sea máxima, denominado punto de silla. Un punto de silla con una única dirección ortogonal donde la energía es máxima se conoce como estado de transición (ET). De una forma más gráfica, se puede definir como máximo relativo de energía que conecta dos mínimos relativos. De la misma forma que puede haber más de dos mínimos, también puede haber más de dos máximos relativos. Estos mínimos y máximos, también conocidos como puntos críticos o estacionarios de la SEP se pueden determinar a través de la derivada de la energía con respecto a las coordenadas. El resultado de estas derivadas debe ser cero o, en la práctica, estar por debajo de un cierto umbral:

$$\frac{\partial E(q_1, q_2 \dots q_n)}{\partial q_i} = 0 \quad (30)$$

Donde q_i son las coordenadas generalizadas de la molécula. La primera derivada de la energía está relacionada también con las fuerzas asociadas al campo, de tal manera

que si el valor de la misma es cero, la suma de todas las fuerzas aplicadas sobre los átomos de la molécula es cero, y de ahí el término estado estacionario.

A través de la segunda derivada se puede caracterizar cada punto crítico como mínimo o máximo. Esto se hace en realidad a través de la matriz Hessiana: si todos los valores propios de la matriz son positivos, nos encontraremos ante un mínimo. Si un valor es negativo mientras todos los demás son positivos, corresponde con un estado de transición mostrando la dirección de la superficie el autovector asociado.

3.2.3 Energía vibracional

Cualquier molécula, en cualquier estado energético mantiene un movimiento vibracional que depende directamente de la temperatura. En 1901, Max Planck dedujo la fórmula de un oscilador atómico aislado como una unidad atómica vibratoria como [50]:

$$U = \frac{hv}{e^{\frac{hv}{kT}} - 1} \quad (31)$$

Donde h es la constante de Planck, v la frecuencia de vibración, k la constante de Boltzmann y T la temperatura.

Sólo unos años más tarde, en 1913, Albert Einstein y Otto Stern propusieron la existencia de una energía residual que todos los osciladores tienen en el cero absoluto. A esta energía residual la denominaron energía del punto cero (ZPE) [51]. Tras unos experimentos con hidrógeno a muy baja temperatura, dedujeron la siguiente fórmula:

$$E = \frac{hv}{e^{\frac{hv}{kT}} - 1} + \frac{hv}{2} \quad (32)$$

Donde E es la energía vibracional de un oscilador cuántico. Por lo tanto, incluso si un sistema molecular alcanza la temperatura de cero absoluto su energía no es cero, sino $\frac{1}{2}hv$.

Dentro de la mecánica cuántica las vibraciones se tratan como si fueran generadas por un oscilador armónico. En aquellas zonas de la SEP donde se encuentra un punto crítico esta se trata como una función cuadrática cuyos primer y segundo coeficientes

son la primera y la segunda derivada de la energía. Recordando que en un punto crítico todas las derivadas de orden uno son iguales a cero, esta aproximación se puede escribir como sigue:

$$E(q) = E_0 + \frac{1}{2} \sum_{ij} F_{ij} (q_i - q_i^0)(q_j - q_j^0) F_{ij} = \frac{\partial^2 E}{\partial q_i \partial q_j} \quad (33)$$

Donde q_i^0 se refiere a las coordenadas generalizadas del punto crítico y F es la matriz de constantes de fuerza o Hessiano. Las frecuencias de vibración armónicas de una molécula se pueden obtener a partir del Hessiano, la geometría molecular y la masa de los átomos resolviendo la ecuación matricial F-G de Wilson:

$$\det(FG - EI) = 0 \quad (34)$$

Donde G es la matriz de energía cinética e I la matriz unidad. Los autovalores E están relacionados con las frecuencias de vibración según la expresión:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{E} \quad (35)$$

Cuando se encuentran combinaciones de coordenadas cuya ecuación matricial FG se puede resolver, se llega a los llamados modos normales de vibración.

3.2.4 Energía electrónica

La aproximación de Born-Openheimer lleva al concepto de superficie potencial. Sin embargo, para determinar esta SEP es necesario resolver la ecuación 1. Como ya se ha dicho con anterioridad, la dificultad reside en las interacciones electrón-electrón y por tanto se precisan técnicas aproximadas.

En química computacional hay tres grupos de métodos para determinar la estructura electrónica: métodos semiempíricos, *ab initio* y de funcional de densidad (DFT).

3.2.4.1 Métodos semiempíricos

Los métodos semiempíricos son los menos precisos de los tres caminos para determinar la energía y estructura electrónicas de una molécula. Emplean un hamiltoniano aproximado y se basan en datos experimentales (de ahí el nombre de semiempírico) para valorar ciertas integrales. Actualmente los más empleados son AM1 [52] y PM3 [53], siendo característicos por incluir dentro del hamiltoniano expresiones para las repulsiones electrónicas.

Este tipo de métodos emplea únicamente los electrones de valencia y aunque resuelven la ecuación de Schrödinger para alcanzar soluciones en forma de orbitales moleculares, debido a las aproximaciones tan importantes que llevan a cabo para algunas partes del Hamiltoniano, las soluciones halladas son meros acercamientos al valor real. La media absoluta de los errores cometidos es bastante más grande que los obtenidos con otros métodos más precisos.

La gran ventaja de los métodos semiempíricos, es la rapidez con que se pueden hacer estos cálculos. Sin duda, se trata de un buen método cuando se buscan soluciones no muy precisas. Además, para el tratamiento de macromoléculas como las proteínas, resulta imposible o casi, aplicar un método *ab initio* o DFT por el gran número de átomos implicados en el cálculo.

3.2.4.2 Métodos *ab initio*

Al contrario que los métodos semiempíricos que emplean aproximaciones y datos empíricos para resolver la ecuación de Schrödinger, los métodos *ab initio* se basan únicamente en la mecánica cuántica y algunas constantes físicas como la velocidad de la luz, masas atómicas, cargas nucleares y electrónicas y la constante de Planck. Las aproximaciones empleadas por estos métodos son más de tipo matemático que químico y se conocen como método de variaciones y teoría de perturbaciones.

En matemáticas, el *cálculo variacional* consiste en buscar máximos y mínimos (o más generalmente extremos relativos) de funcionales continuos definidos sobre un espacio vectorial. El método de variaciones en mecánica cuántica enuncia que si un

sistema tiene un operador Hamiltoniano \hat{H} y Ψ es cualquier función de onda “bien comportada” que satisfaga las condiciones de frontera del sistema, entonces:

$$\int \Psi^* H \Psi d\tau \geq E_{basal} \quad (36)$$

Donde E_{basal} es el *autovalor* más bajo de la energía del sistema (el estado fundamental) y el diferencial $d\tau$ representa la coordenada o las coordenadas sobre las cuales se lleva a cabo la integración. En otras palabras, puede obtenerse una solución aproximada correspondiente al estado cuántico de energía más baja, el *estado basal*, escogiendo una función de onda aproximada Ψ y ajustando los parámetros de Ψ para lograr una energía mínima. La forma más habitual de enunciar esta premisa, mostrando explícitamente el procedimiento de normalización es la siguiente:

$$E_{basal} \leq E = \frac{\langle \Psi | H | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} = \frac{\int \Psi^* H \Psi d\tau}{\int \Psi^* \Psi d\tau} \quad (37)$$

Cabe destacar dentro de estos métodos los llamados “*Coupled Cluster*” [54, 55] en los que la función de onda es de tipo exponencial. Actualmente son los métodos más precisos y parten de una función de orden cero construida a partir de un solo determinante. Su gran inconveniente es el elevado coste computacional. De hecho son únicamente empleados para moléculas de muy pequeño tamaño.

La teoría de perturbaciones es un conjunto de esquemas aproximados para describir sistemas cuánticos complicados en términos de otros más sencillos. La idea es empezar con un sistema simple y gradualmente ir activando hamiltonianos “perturbativos”, que representan pequeñas alteraciones al sistema. Si la alteración o perturbación no es demasiado grande, las diversas magnitudes físicas asociadas al sistema perturbado (por ejemplo sus niveles de energía y sus estados propios) podrán ser generadas de forma continua a partir de los del sistema sencillo. De esta forma, podemos estudiar el sistema complejo basándonos en el sistema sencillo.

En particular al estudiar las energías de un sistema físico, el método consiste en identificar dentro del Hamiltoniano (perturbado) qué parte de éste corresponde a un problema con solución conocida (Hamiltoniano no perturbado y considerar el resto como un potencial que modifica al anterior Hamiltoniano. Dicha identificación permite

escribir a los autoestados del Hamiltoniano perturbado como una combinación lineal de los autoestados de aquel sin perturbar y a las autoenergías como las autoenergías del problema sin perturbar más términos correctivos.

Los modelos basados en la teoría de perturbaciones, en resumen, dividen el hamiltoniano en dos partes:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \lambda V \quad (38)$$

Donde \hat{H}_0 es el hamiltoniano sin perturbar, V es un potencial que modifica al Hamiltoniano y λ es la magnitud de la perturbación. Si la perturbación es desarrollada en una serie, cada término nos acerca más al valor exacto de energía, encontrándose la energía total para un desarrollo de infinitas perturbaciones. En la práctica, sólo es necesario determinar el valor de unas pocas perturbaciones para dar una solución bastante próxima a la real. El método perturbacional más utilizado es el propuesto por Møller y Plesset (MPn) [56]

3.2.4.3 Métodos de funcional de densidad.

La Teoría del Funcional Densidad (DFT, por sus siglas en inglés), aplicada a sistemas electrónicos, es un procedimiento variacional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger, donde el funcional de la energía electrónica es minimizado con respecto a la densidad electrónica. Es uno de los métodos más utilizados en los cálculos cuánticos de la estructura electrónica de la materia, tanto en la física de la materia condensada como en la química cuántica.

Según este método, la energía asociada al estado fundamental de un sistema electrónico sometido a un campo externo, puede expresarse como una función que depende exclusivamente de la densidad electrónica, ρ .

El mínimo de esta función nos devuelve la densidad de partículas del sistema. Se trata de métodos intermedios entre los semiempíricos y los *ab initio*, resultando ser una solución a la baja precisión de los primeros y al alto coste computacional de los segundos.

El más utilizado actualmente es el B3LYP, basado en el híbrido de tres parámetros de Becke unido al funcional de correlación con corrección de gradiente de Lee, Yang y Parr [57].

3.2.5 Conjuntos de bases

De forma general, los orbitales atómicos (OA) están descritos por sus coordenadas, las cuales se componen de una parte radial y otra angular:

$$X_{\mu} = R(r) \Psi_{l,m}(\theta, \varphi) \quad (39)$$

Donde $R(r)$ es la parte radial del orbital y $\Psi_{l,m}(\theta, \varphi)$ la parte angular (armónicos esféricos).

Para determinar la densidad electrónica de una molécula, hay que conocer previamente los orbitales moleculares de la misma, los cuales se pueden obtener mediante la combinación de OA y a su vez, cada uno de estos viene dado por la combinación lineal de funciones de base. Las funciones base pueden ser de diversos tipos, a saber:

a) Orbitales hidrogenoides

$$\Psi = \chi = NP_{n,l}(r)e^{-r\zeta/na}Y_l^m \quad (40)$$

Donde ζ es la carga efectiva, aunque en muchos casos recibe el nombre de exponente orbital e Y_l^m es el armónico esférico correspondiente.

b) STO (*SlaterTypeOrbitals*)

En este tipo de orbitales la parte radial depende únicamente del número cuántico "n":

$$\Psi_{\text{STO}} = \chi = \frac{q(2\zeta/a)^{n+1/2}}{[(2n)!]^{1/2}} r^{n-1} e^{-r\zeta/na} Y_l^m \quad (41)$$

c) GTO (*Gaussian Type Orbitals*)

Las gaussianas tienen la particularidad matemática de que facilitan enormemente la resolución de las integrales bielectrónicas extendidas a dos centros. Este tipo de orbitales viene especificado mediante las expresiones:

$$\chi(\text{GTO}) = r^{n-1} e^{-r^2\zeta/na^2} Y_l^m \quad (42)$$

$$\chi(\text{GTO}) = x^i y^j z^k e^{-r^2\zeta/na^2} Y_l^m \quad (43)$$

Dado que la parte radial de estas funciones es sumamente compleja y complica sobremanera la resolución de las integrales bielectrónicas, a menudo se emplea una combinación lineal de funciones gaussianas:

$$X_\mu = \sum_i d_{i\mu} g_\mu \quad (44)$$

Donde X_μ representa cada orbital atómico, $d_{i\mu}$ es un coeficiente y g_μ es una gaussiana primitiva, que consiste en potencias de x, y, z multiplicadas por una exponencial ($-\alpha r^2$), siendo α una constante que determina el tamaño o extensión radial de la función. Las bases pueden ser:

1. Base mínima: STO-nG ($2 \leq n \leq 6$)

Cada OA se obtiene como combinación lineal de n gaussianas.

$$\phi_{1s} = \sum_{s=1}^n c_s \chi_s(\text{GTO}) \quad (45)$$

$$\phi_{2s} = \sum_{s=1}^n c_s \chi_s(\text{GTO}) \quad (46)$$

Para cada orbital de los diferentes átomos el grupo de Pople determinó los valores de ζ y c_s . En el segundo periodo de la tabla periódica, desde el B hasta el Ne, todos los átomos presentan 5 orbitales (1s, 2s, 2px, 2py y 2pz). Para que todo el periodo sea homogéneo, al Li y Be también se le añaden 3 orbitales 2p.

Una de las bases más utilizadas es la STO-3G en donde cada OA se genera como combinación lineal de tres gaussianas. El exponente orbital indica lo compacto que es

el orbital. Valores altos del mismo indican orbitales compactos cercanos al núcleo y por eso poco energéticos. Valores bajos del mismo indican orbitales difusos y muy energéticos.

2. Bases Doble Zeta (DZ) o *split-valence*

En algunos casos los anteriores orbitales no permiten representar los orbitales atómicos correctamente, por lo que hay que intentar ampliar la base. Si por ejemplo consideramos una molécula de agua y su catión hidronio, la molécula neutra tiene 8 electrones externos atraídos por 10 protones mientras que el catión está formado por 8 electrones y 11 cargas nucleares. Esto tiene como consecuencia que en el catión los electrones se aproximen a los núcleos. Los orbitales del tipo STO-nG no pueden contemplar este tipo de contracción. Por esta razón se definen los “orbitales partidos” o doble zeta en donde cada orbital atómico externo se dobla uno de ellos compacto y el otro difuso. El interior (*inner*) es más pequeño y compacto, mientras que el exterior (*outer*) es más grande y difuso. Se utilizan bases doble-, triple-, n-zeta para los orbitales de valencia mientras que se utiliza una base mínima para los orbitales internos.

Como norma general se puede afirmar que al aumentar las gaussianas de los orbitales internos se mejora el valor de la energía y aumentando las de los orbitales externos se mejora la geometría molecular. Las bases doble Z más corrientes son 4-31G y 6-31G y las triple Z 6-311G en donde los orbitales internos se desarrollan sobre 6 gaussianas y los de valencia de triplican y se desarrollan sobre tres, una y una gaussiana respectivamente.

3. Bases con polarización (DZp, DZdp, TZp, TZdp)

Cuando dos átomos se aproximan para enlazarse y formar una molécula, sus OA se deformarán ligeramente. A este efecto se le denomina polarización de los OA. Este efecto se puede conseguir introduciendo nuevas bases que presenten una simetría adecuada.

Las bases del tipo 6-31G* (DZp) son bases del tipo 6-31G a las que se les ha añadido un conjunto de 6 orbitales "d" (equivalentes a 5 orbitales d y 1 s) para los elementos diferentes a H (se ha añadido la polarización a los átomos pesados). En las bases 6-

31G** (DZdp) se ha añadido adicionalmente un conjunto de 3 orbitales p para los átomos de hidrógeno (doble polarización).

Las bases 6-311G* (TZp) son bases del tipo 6-311G (TZ) a las que se ha añadido la polarización a los átomos pesados. Las bases 6-311G** son iguales que las anteriores pero también presentan polarización para los hidrógenos (dp).

Normalmente para introducir la polarización las bases tienen que ser de calidad, como mínimo DZ. Si se introduce la polarización en bases peores no se consiguen buenos resultados.

4. Bases Aumentadas Difusas

En este caso se introducen conjuntos de gaussianas muy difusas, es decir con bajos exponentes orbitales. Estas bases son imprescindibles para explicar el comportamiento de aniones y compuestos con pares de electrones solitarios.

Las dos bases de Pople más usadas de este tipo son las bases 6-31+G* que son bases del tipo 6-31G* a las que se le han añadido un conjunto de 4 orbitales (1s y 3p) difusos, es decir con exponentes muy bajos (entre 0.1 y 0.01), para los átomos pesados; y las 6-31++G* que son iguales que las anteriores pero se han añadido funciones "s" a los protones. Otras funciones muy utilizadas son las 6-31+G** y 6-31++G**.

3.3 Métodos empleados

Durante el período de investigación fue necesario el soporte de la química computacional para complementar y apoyar los datos experimentales encontrados. Para ello, se emplearon dos programas de cálculo fundamentalmente: Spartan y Gaussian 09 [58]. El primero con una función de cribado para encontrar rápidamente los isómeros estructurales más estables. Si bien se emplearon para ello métodos semiempíricos tales como PM3, los de más baja energía fueron optimizados a nivel DFT utilizando Gaussian posteriormente para definir mejor sus estructuras y energía. Los métodos empleados fueron: M05-2X, B3LYP y M06 El método empleado en todos los casos fue B3LYP con bases diversas tales como: 6-311++G(d,p), 6-31+G(d,p) y 6-

311++G(3df,2p). Con esta metodología se determinaron también frecuencias de vibración con fines termodinámicos.

Métodos *ab initio*. Tanto para la optimización de estructuras como para la determinación de las frecuencias vibracionales. Se utilizaron métodos CC con bases n-zeta de tipo cc-pvTZ y las denominadas LAN (LANL2) que incluyen correcciones relativistas para átomos pesados y métodos MP2 con la base 6-311++G(3df,2p) con correcciones para problemas de superposición [59]. También se emplearon modelos teóricos basados en métodos Gn, concretamente G3 [60] y G4 [61].

4. RESULTADOS

Como ya se ha descrito en la introducción de esta tesis, el eje alrededor del cual gira todo el trabajo de doctorado es la espectrometría de masas. Si bien en ciertos casos ha sido imprescindible el uso de la química computacional para contrastar y/o contextualizar los resultados experimentales hallados, ha sido la espectrometría de masas en su visión más amplia la herramienta que ha vertebrado el presente trabajo. Asimismo es importante mencionar el uso intensivo de metodologías implementadas *ex-profeso* por nuestro grupo para el estudio tanto de propiedades químico físicas como de caracterización estructural de una amplia variedad de especies, varias de ellas de síntesis.

Con la intención de plasmar por escrito con la máxima claridad posible los diferentes hitos alcanzados y el porqué de su cronología, se ha dividido este capítulo en cuatro sub- apartados, a saber:

- I. **Acidez y Basicidad en fase gas.** Se estudiaron procesos de transferencia protónica en moléculas con interés fundamental y/o aplicado. Estos procesos se estudian en términos de variación de la energía libre de Gibbs asociada al enlace molécula-protón. Se trata de una reacción vital que puede provocar cambios estructurales y reacciones en cadena dentro de sistemas más complejos. Los trabajos incluidos en este apartado han sido publicados o están en preparación para ser publicados:
 - Gas phase acidity measurement of local acidic groups in multifunctional species: Controlling the binding sites in hydroxycinnamic acids [27].
 - Experimental and Computational Gas Phase Acidity of Cyclic Ureas. The Case of Two Acidic Sites in Barbituric Acid (*En preparación*).
 - Intrinsic (gas-phase) acidity and basicity of paracetamol [62].
 - Can an Amine Be a Stronger Acid than a Carboxylic Acid? The Surprisingly High Acidity of Amine–Borane Complexes[63].
 - Acidities of *closo*-1-COOH-1,7-C₂B₁₀H₁₁ and Amino Acids Based on Icosahedral Carbaboranes [64].

II. **Estructura y energética.** Los trabajos aquí descritos incluyen estudios no sólo de transferencia protónica, sino también la energía asociada a otros enlaces y la estructura resultante de su fragmentación. Son varias las técnicas empleadas para este fin:

- A silver complex of chloroquine: synthesis, characterization and structural properties [65].
- Anionic Oligomerization of $\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$ and $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$: An Experimental and Computational Study [26].
- Static and Dynamic Properties of 1,1'-Bi-2-naphthol and Its Conjugated Acids and Bases [66].
- Intramolecular Base-Assisted $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$ Bond Activations in Sulfonated NHC Platinum Complexes in the Gas-Phase (*En preparación*).
- Dinámica de disociación y calor de formación de tetraetilsilano, clorotrietilsilano y diclorodietilsilano (*En preparación*).

III. **Química Analítica.** Este apartado recoge trabajos que son fruto de colaboraciones con otros grupos de investigación. Nuestra participación no solo ha aportado el uso de técnicas y metodologías analíticas muy específicas, sino también la dilucidación de procesos dentro del contexto de la energética molecular:

- Investigating the Thermal Decomposition of Starch and Cellulose in Model Systems and Toasted Bread Using Domino Tandem Mass Spectrometry [67].
- Impact of Glutathione-Enriched Inactive Dry Yeast Preparations on the Stability of Terpenes during Model Wine Aging [68].

IV. **Resolución isomérica.** Durante la realización de tareas analíticas rutinarias (HPLC-MS) encontramos que en casi todas las muestras naturales de origen vegetal existen isómeros estructurales con la misma relación m/z y, que, en principio, eluyen a diferentes tiempos de retención. El problema surge cuando no hay una identificación previa del analito o se han cambiado las condiciones cromatográficas. De la necesidad de poder diferenciar isómeros estructurales en muestras complejas, empezamos a desarrollar una metodología basada en

la energética molecular en fase gas aplicable a la química analítica. Pese a estar incompleta esta metodología, describimos y analizamos los resultados preliminares obtenidos en el siguiente trabajo:

- Distinguishing Chlorogenic Acids isomers by Energy Resolved Mass Spectrometry (*En preparación*).

4.1 Acidez y basicidad en fase gas

Las reacciones por transferencia de protones juegan un papel importante y decisivo en una amplia variedad de procesos biológicos, industriales, tecnológicos y medio-ambientales. La acidez en fase gas (GA) de un compuesto AH se define como el valor negativo de la energía libre de Gibbs de la reacción de desprotonación [69]:



La variación de esta energía nos da una idea de la espontaneidad de la misma. De esta manera, la determinación de la acidez o basicidad de una molécula en fase gas en estos términos nos dice cómo será la tendencia de esta a perder o ganar un protón.

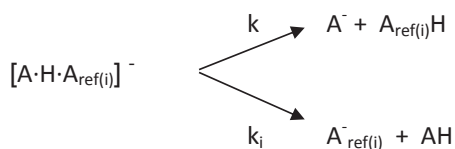
El estudio de estos fenómenos ha sido el eje sobre el que han girado la mayoría de los trabajos de nuestro grupo de investigación [70-73]. La disponibilidad de instrumentos como el espectrómetro de masas TQ/FT-ICR con fuente ESI y de diseño único nos permitió implementar metodologías (p. ejem. EKM) para cuantificar con éxito procesos de transferencia protónica, en fase gas, de una amplia variedad de especies (orgánicas e inorgánicas) incluyendo aquellas termolábiles, que con métodos de equilibrio convencionales habría sido prácticamente imposible determinar u acidez y/o basicidad intrínseca.

Gracias al desarrollo de nuevas fuentes de ionización en espectrometría de masas (ESI), es posible estudiar propiedades energéticas y estructurales de biomoléculas termolábiles y/o de especies cuya presión de vapor es muy baja, tales como ureas, aminoácidos, etc. En este contexto, el denominado “método cinético”, se ha empleado ampliamente en el estudio de propiedades termoquímicas de especies neutras e ionizadas.

El método cinético (KM) desarrollado por Cooks y col. en 1977 [74, 75] supuso una enorme contribución en la determinación de parámetros termodinámicos en fase gas. Está basado en los “ratios” de disociación de dímeros formados por dos especies, A y $A_{\text{ref}(i)}$, siendo A la muestra cuyo valor queremos determinar y $A_{\text{ref}(i)}$ la muestra de referencia con valor conocido. En la década de los '90 R. Graham Cooks y Philip S. H. Wong [76]. mejoran el método y lo llaman método cinético extendido (Extended Kinetic Method). Esta ampliación permite la determinación experimental de las entalpías y entropías del mismo proceso.

Ya que este es el método empleado en todos los trabajos aquí reflejados, se describe de manera general a continuación. Para no repetir el mismo desarrollo dos veces, se describe únicamente para el caso de especies aniónicas.

En primer lugar es necesario formar un dímero entre A y $A_{\text{ref}(i)}$, $A \cdot H \cdot A_{\text{ref}(i)}$ en disolución. Este dímero unido por un enlace de hidrógeno es llevado a fase gas e ionizado por el electrospray. En el paso siguiente será sometido a fragmentación dando como resultado un esquema como el siguiente (esquema 1):



Esquema 1. Disociación de un dímero aniónico.

Las constantes k y k_i nos dan información cualitativa a cerca de la intensidad de la barrera en ambos caminos disociativos [76, 77]. Este método tiene grandes ventajas sobre otros empleados años atrás y/o con otros espectrómetros de masas: el primero y más importante es que no importa la volatilidad del analito, ya que únicamente necesita ser disuelto en un solvente polar; la segunda es que no afecta la presencia de contaminantes mientras su concentración sea pequeña; la última es que este método no sólo sirve para determinar ΔG , ΔH y ΔS de reacciones de protonación – desprotonación, sino también en reacciones de quiralidad, afinidad por metales y estructuras de complejos metálicos con biomoléculas por citar sólo algunos [76].

Desde un punto de vista práctico, la fragmentación del dímero resulta en dos aniones (esquema 1) cuya población es directamente proporcional a la intensidad de

su pico en el espectro de masas. De esta forma, la especie más ácida tenderá a liberar el protón más rápido que la otra, formándose más deprisa y siendo su intensidad relativa mayor. Sobre esta premisa, para obtener la *GA* de un compuesto mediante el método cinético simple se toma la siguiente relación:

$$\ln\left(\frac{k}{k_i}\right) = \ln\left(\frac{[A^-]}{[A_{\text{ref}(i)}^-]}\right) \approx \frac{\Delta_a G_{\text{ref}} - \Delta_a G}{RT_{\text{eff}}} \quad (48)$$

Donde T_{eff} es la temperatura efectiva del heterodímero activado y que depende de las condiciones de ionización y disociación.

Una de las asunciones que se hacen en este método es que las diferencias de entropía entre ambas vías deben ser cero. Con lo cual la diferencia de entropía entre bases de referencia debe ser lo más pequeña posible en la práctica. Así pues, de la ecuación general de la termodinámica,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \cong \Delta G = \Delta H \quad (49)$$

Posteriores trabajos demostraron que desestimar la entropía del proceso llevaba a importantes errores de medida, tal como muestran los trabajos de Fenselau [78], Wesdemiotis [79], Armentrout[80] y Ervin [81]. Estas observaciones llevarían al desarrollo del actual método cinético extendido, donde se tiene en cuenta la entropía en la fragmentación y se amplía la ecuación 47, quedando como sigue:

$$\ln\left(\frac{k}{k_i}\right) = \ln\left(\frac{[A^-]}{[A_{\text{ref}(i)}^-]}\right) = \frac{\Delta_a G_{\text{ref}} - \Delta_a G}{RT_{\text{eff}}} = \frac{\Delta_a H_{\text{ref}} - \Delta_a H}{RT_{\text{eff}}} + \frac{\Delta(\Delta S)}{R} \quad (50)$$

Para reducir el error asociado a la entalpía y reducir el efecto que supone su propagación, se toma la media de las entalpías de las referencias empleadas [80] quedando la ecuación 49 como sigue:

$$\ln\left(\frac{[A^-]}{[A_{\text{ref}(i)}^-]}\right) = -\frac{\Delta_a H_{\text{ref}} - \Delta_a H_{\text{avg}}}{RT_{\text{eff}}} - \left(\frac{\Delta_a H - \Delta_a H_{\text{avg}}}{RT_{\text{eff}}} - \frac{\Delta_a S - \Delta_a S_{\text{ref}}}{R}\right) \quad (51)$$

A partir de aquí se realizan dos representaciones termocinéticas siguiendo esta ecuación. En la primera se representan los valores experimentales de $\ln\left(\frac{[A^-]}{[A_{\text{ref}(i)}^-]}\right)$

frente a $\Delta_a H_{\text{ref}} - \Delta_a H_{\text{avg}}$. Hay que tener en cuenta que los experimentos de fragmentación se llevan a cabo a varias energías de colisión, resultando un valor de $\frac{1}{RT_{\text{eff}}}$ para cada una. Esto se repite para todas las referencias utilizadas. Como resultado se obtiene un conjunto de rectas, una para cada energía de colisión. El valor de la pendiente es $\frac{1}{RT_{\text{eff}}}$ y el valor de la ordenada en el origen es $-\left(\frac{\Delta_a H - \Delta_a H_{\text{avg}}}{RT_{\text{eff}}} - \frac{\Delta_a S - \Delta_a S_{\text{ref}}}{R}\right)$. En la segunda representación se toman los valores de las pendientes y los cortes en el eje de ordenadas “y” de la primera gráfica. La correspondiente regresión lineal de esta recta nos da unos valores de pendiente y ordenada en el origen de donde se obtienen $\Delta_a H - \Delta_a H_{\text{avg}}$ y $\frac{\Delta_a S - \Delta_a S_{\text{ref}}}{R}$ respectivamente. $\Delta_a H$ se puede obtener ya que $\Delta_a H_{\text{avg}}$ es conocido. Si las referencias son elegidas con similares entropías de desprotonación el término $\Delta_a S_{\text{ref}}$ puede ser sustituido por la entropía media de desprotonación de las referencias $\Delta_a S_{\text{avg}}$ de forma que $\Delta_a S$ también es obtenido. Finalmente la GA es obtenida a partir de la ecuación 3 donde $T = 298.15 \text{ K}$.

4.1.1 GA en moléculas polifuncionales: ácidos hidroxicinámicos

4.1.1.1 Introducción

En el presente trabajo [27], se determinó la GA de ácidos hidroxicinámicos, potentes antioxidantes presentes en multitud de plantas con interés medicinal.

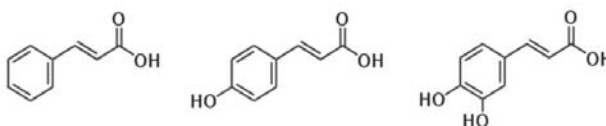
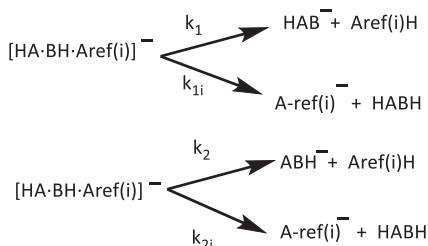


Figura 13. Ácidos *trans*-cinámico, *para*-cumárico y cafeico.

Dada la baja volatilidad de estas moléculas, se consideró el uso del método cinético extendido. En un principio, este trabajo no planteó ningún problema adicional, no obstante, la presencia de dos centros ácidos, e incluso tres en el caso del ácido cafeico, arrojaron unos resultados que nos replantearon el papel de las moléculas polifuncionales en el desarrollo del método EKM.

Desde un punto de vista teórico, la presencia de dos o más centros ácidos, provoca la aparición de hasta cuatro canales de disociación (esquema 2):



Esquema 2. Diagrama de disociación de una molécula bifuncional.

En 1994, Hoke y sus colaboradores, estudiando la afinidad protónica de ciertos radicales fenoxilo bifuncionales, encontraron una tendencia doble en la representación de $\ln\left(\frac{[A^-]}{[A_{\text{ref(i)}}^-]}\right)$ frente a la GA_{ref} [82]. Hay que recordar que cuando ellos realizaron este experimento, el método extendido no estaba aún desarrollado y las medidas se hacían directamente sobre las GA de las referencias. Si bien este grupo describió este resultado, no se ha encontrado en bibliografía ningún caso previo al nuestro en el que se racionalice el efecto de moléculas polifuncionales sobre el método EKM.

4.1.1.2 Resultados

El interés y la dificultad de este trabajo es precisamente haber determinado con bastante precisión la GA en ambos centros, -OH y -COOH. En la siguiente tabla se muestran los resultados de GA obtenidos:

	$\Delta_{\text{acid}}H^a$		$\Delta_{\text{acid}}G^a$		ΔS^b	
Cinámico	341,3±1,9	<i>341.4</i>	334,5±1,9	<i>333.2</i>	23,0±2,0	<i>27.5</i>
Cumárico (COOH)	339,1±2,0	<i>342.9</i>	332,7±2,0	<i>334.8</i>	21,5±2,0	<i>27.2</i>
Cumárico (OH)	324,2±2,1	<i>327.8</i>	318,3±2,1	<i>320.7</i>	20,0±2,0	<i>23.8</i>
Cafeico (COOH)	339,1±2,0	<i>342.0</i>	332,2±2,0	<i>333.8</i>	23,3±2,0	<i>27.5</i>
Cafeico (OH)	338,5±6,0	<i>320.0</i>	326,5±6,0	<i>313.4</i>	40,4±5,2	<i>22.1</i>
Ácido cafeico /m-OH		<i>325.6</i>		<i>319.0</i>		<i>22.1</i>

Tabla 1. Parámetros termoquímicos de desprotonación obtenidos mediante el EKM para los compuestos de estudio. ^a kcal/mol. ^b cal/mol K. En cursiva los valores calculados a nivel B3LYP/6-311++G(3df,2p).

4.1.1.3 Condiciones experimentales

Los experimentos fueron llevados a cabo en el espectrómetro TQ 320-MS con una presión del gas de colisión igual a 0.2 mbar. La energía del centro de masas del sistema de colisión viene descrita por la ecuación 52:

$$E_{cm} = E_{lab} \left[\frac{m}{(M + m)} \right] \quad (52)$$

Donde E_{lab} es la energía del sistema de colisión respecto del laboratorio, m es la masa del gas de colisión y M la del heterodímero. Si bien estas condiciones se mantuvieron constantes para todos los experimentos, fueron los disolventes y el gas de secado los que se modificaron con el fin de separar y seleccionar cada heterodímero.

La temperatura del gas de secado es uno de los dos parámetros críticos a la hora de modificar la población de dímeros unidos por el grupo hidroxilo y por el carboxilo en los ácidos cumárico y cafeico. Para demostrar este hecho, se varió la temperatura manteniendo el resto de variables constantes.

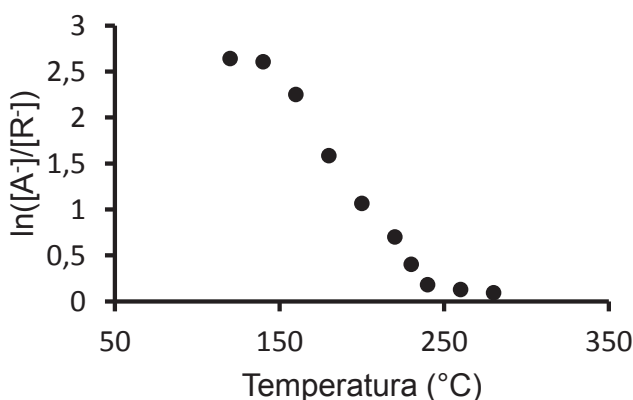


Figura 14. Variación de los productos con la temperatura del gas de secado para el heterodímero formado entre el ácido cumárico y el benzoico. $E_{cm}=1,5$ eV.

Como se explica en el apartado 4.1 de la presente tesis, la fragmentación de un dímero unido por un enlace de hidrógeno da como resultado dos picos en el espectro correspondiente a cada uno de los iones que se pueden formar. Mientras se variaba la

temperatura, se fue registrando el $\ln\left(\frac{[A^-]}{[A_{\text{ref}(i)}^-]}\right)$ (figura 14) viéndose una clara evolución en el ratio del cumarato y del benzoato.

La explicación a este hecho es que en disolución convivan los dímeros unidos por ambos centros, y que al variar el entorno de ionización, en concreto la temperatura del gas de secado, se fomente la producción de uno frente al otro en fase gas.

El otro parámetro importante que ayuda a seleccionar uno de los dos heterodímeros o clústeres es el disolvente. Obviamente, que la unión de muestra y referencia se haga por un sitio o por otro de la muestra, da como resultado dos dímeros con polaridad y momento dipolar distintos. La explicación que damos a este fenómeno es la diferencia de acidez de ambos grupos en disolución y en fase gas. Se sabe que en disolución el grupo más ácido del ácido cumárico es el carboxilo ($pK_a = 4$) [83], mientras que en fase gas la tendencia se invierte y es el hidroxilo quien libera más rápidamente su protón [84]. Si al disolver la muestra lo hacemos en un disolvente prótico, el ácido carboxílico se desprotonará con mayor facilidad, dando por tanto una población de dímeros unidos por ese grupo en mayor proporción. Si por el contrario el disolvente es aprótico, la población de partida se nivelará en favor del hidroxilo (figura 15).

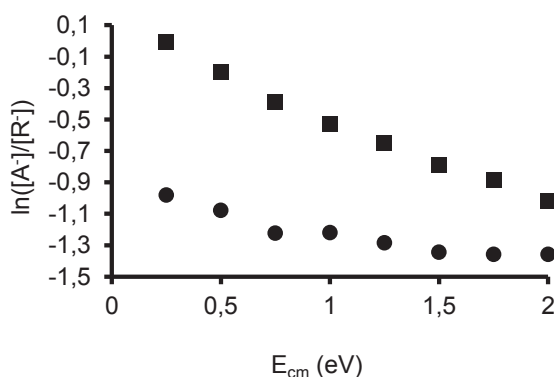


Figura 15. Variación de los productos con la energía de disociación para el heterodímero formado entre el ácido cumárico y el p-nitro-fenol disueltos en acetonitrilo (■) y agua (●).

4.1.1.4 Conclusiones

Para el ácido cumárico se pudo determinar la GA en sus dos grupos funcionales, los cuales concuerdan muy bien con los determinados mediante cálculos computacionales. En el caso del ácido cafeico, los valores no son tan buenos. La explicación que damos es la interferencia que puede crear la formación de un triple enlace de hidrógeno entre ambos grupos hidroxilo y la molécula de referencia.

Tanto a la hora de determinar una GA como a la hora de evitar la formación de dímeros molestos en espectrometría de masas (duplicidades molestas en HPLC-MS) las condiciones de ionización y la preparación de la muestra son parámetros críticos.

4.1.2 GA en ácido barbitúrico y derivados

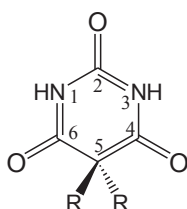
El artículo correspondiente a este trabajo se encuentra actualmente en preparación. Con la finalidad de confirmar la metodología descrita para los ácidos hidroxycinámicos (ver 4.1.1.3) se llevó a cabo el estudio de las propiedades termoquímicas del ácido barbitúrico (con centros ácidos $-\text{CH}$ y $-\text{NH}$) y derivados. En un intento por reproducir esta metodología en otra familia de moléculas, llegamos a la conclusión de que medir la GA en moléculas polifuncionales, si bien es posible, depende de una serie de factores experimentales correspondientes a las condiciones de ionización y geometría de la molécula (momento dipolar e interacción con el disolvente) que hacen difícil la reproducción de este método en cualquier sistema molecular. En otras palabras, este trabajo es la confirmación de que modificando las condiciones experimentales podemos hacer prevalecer un dímero sobre otro, y determinar la GA de ambos, sin embargo no todas las moléculas con más de un centro ácido o básico se adaptan a los criterios necesarios.

4.1.2.1 Introducción

El ácido barbitúrico es un compuesto orgánico sintetizado por primera vez en 1864 por Adolf von Baeyer [85]. Está basado en un esqueleto heterocíclico de pirimidina y como producto farmacéutico ha sido empleado ampliamente en la preparación de derivados como los barbituratos. Estos derivados son conocidos en química médica por sus propiedades como hipnóticos, sedativos, anticonvulsionantes y anestésicos [86,

87]. Incluso, en los últimos tiempos se han encontrado actividades como fungicida, antiviral y antitumoral [88].

El barbitúrico por sí mismo no tiene actividad biológica, sin embargo cuando se ve modificado en el carbono C5, se vuelve activo como fármaco (figura 16). Los análogos sustituidos en C5 muestran una amplia actividad biológica y farmacológica[89].



R=H [1]; R=CH₃ [2]; R=CH₃CH₂ [3]

Figura 16. Estructura del ácido 5,5-dialquilbarbitúrico

En el presente trabajo se investiga la GA del ácido barbitúrico, 5,5-dimetilbarbitúrico y barbital. El objetivo de este estudio es doble: por una parte obtener las GAs de estas moléculas, justificando el valor más ácido del barbitúrico en el C5; por otra parte, como ya se ha dicho unas líneas más arriba, se intentó determinar con la mayor precisión el valor de acidez en el nitrógeno.

Conviene aclarar que el valor de acidez del barbitúrico ya fue medido por McMahon y Kebarle[90] , sin embargo y a pesar de su argumentación en favor del carbono como sitio más ácido, dan su valor en relación a una escala relativa y no absoluta. Tiempo más tarde, Cumming y Kebarle[90] dieron un valor en función del trabajo anterior de 327,3 kcal mol⁻¹ el cual está publicado en el NIST[91]. De acuerdo a nuestros resultados previos, este valor correspondería con la GA del nitrógeno. En un intento para explicar esta dicotomía, decidimos aplicar la metodología empleada anteriormente (ver 4.1.1) eligiendo las moléculas disustituidas en el carbono C5 como modelo de “sitio bloqueado”.

4.1.2.2 Método Experimental

Todas las sustancias aquí estudiadas así como las referencias empleadas en el proceso fueron compradas a Sigma-Aldrich y Alfaesar y usadas sin purificación

adicional. La elección de las referencias fue hecha en base a los valores publicados en la base de datos del NIST [91].

Los experimentos fueron llevados a cabo en el espectrómetro TQ-MS/320. Las disoluciones stock fueron preparadas a $\sim 10^{-3}$ M de concentración en acetonitrilo-agua 1:1 para el barbitúrico y metanol para las demás. Muestra y referencias fueron mezcladas en proporción 1:1 y diluidas hasta alcanzar una concentración de $\sim 10^{-5}$ M. La disolución fue inyectada directamente con un flujo de $10 \mu\text{L min}^{-1}$. La temperatura del gas de secado y el potencial de la aguja se optimizaron entre 100 y 280 °C y -3,5 y -6,0 kV respectivamente. La optimización de estos dos parámetros fue la clave para determinar la acidez en dos sitios de la misma molécula. El dímero formado por muestra y referencia fue guiado por el primer cuadrupolo y sometido a fragmentación en el segundo. La presión del argón (gas de colisión) se situó a 0,4 mTorr en el rango de energías de 0,75 a 2,25 eV en el centro de masas.

4.1.2.3 Detalles computacionales

Las energías de los compuestos se calcularon empleando dos modelos teóricos diferentes de n-gaussianas: G3 y G4.

G3 trabaja a nivel QCISD (*Quadratic Configuration Interaction-size consistency*), y fue desarrollado por John Pople [92] y cuyos resultados son comparables a los del denominado “*coupled cluster*” (CCSD) [93]. La base 6-311G se sustituye por 6-31G, más pequeña. El nivel G3 “*large*” incluye una modificación en el conjunto de bases donde la base 6-311+G(3df,2p) incluye más funciones de polarización para el orbital f.

G4 es el más reciente método basado en n-gaussianas [61]. La teoría G4 modifica a la G3 de hasta cinco maneras: i) un procedimiento de extrapolación para obtener el límite de Hartree-Fock para la inclusión del cálculo total de la energía, ii) incremento de la polarización del set de orbitales d (3d) en la primera fila de átomos y 4d en la segunda con reoptimización para los exponentes en 4d, iii) reemplazo del método QCISD(T) por el método CCSD(T), iv) las geometrías y energías del punto cero (ZPE) se obtienen al nivel B3LYP/6-31G(2df,p) y, v) se tienen en cuenta dos nuevos niveles de energía más altos para especies radicales o con un único par de electrones de valencia.

4.1.2.4 Selección del dímero unido por enlace de hidrógeno

En el caso de tener una molécula con más de un centro ácido por el que pueda formar un enlace de hidrógeno, es fácil encontrar un resultado de GA ponderado. Con el fin de obtener un valor de GA correspondiente a cada centro (-CH y -NH) es necesario aislar el dímero con la estructura deseada lo mejor posible. Este objetivo puede alcanzarse teniendo en cuenta los diferentes factores que afectan al proceso de ionización.

La relación entre la temperatura del gas de secado y la pureza del dímero estudiado fue ya publicada por nuestro grupo [27]. Normalmente cuando una molécula se une a otra por diferentes partes, el momento dipolar de esta cambia al cambiar su geometría, y consecuentemente su energía de solvatación. Este proceso es tanto más efectivo en el dímero cuyo momento dipolar es más débil ya que la energía de solvatación se define como el cambio en la energía libre de Gibbs necesaria para transferir una molécula desde el vacío a disolución. Aunque el ácido barbitúrico tiene un momento dipolar casi nulo debido a su alta simetría, cuando se combina con la referencia se reduce esta, aumentando el momento dipolar. A pesar de este aumento, el aporte energético que le da la alta temperatura del gas de secado no es suficiente para formar el dímero a través del Nitrógeno. En este sentido, el aumento del potencial de ionización en la aguja del electrospray es el otro factor clave para alcanzar tal objetivo. Para visualizar la influencia de ambos parámetros gráficamente, se ha diseñado un gráfico en tres dimensiones, muy útil para la optimización de dos parámetros simultáneos (figura 17).

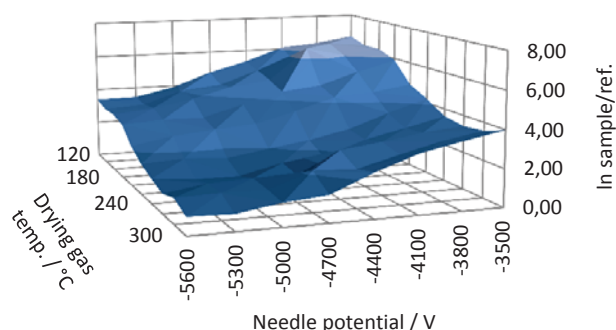


Figura 17. Gráfico del logaritmo natural del ratio de los fragmentos, $\ln\left(\frac{[A^-]}{[A_{ref(i)}^-]}\right)$ para AH = ácido barbitúrico y $A_{ref(i)}H$ = ácido 3-clorobenzóico frente a la temperatura del gas de secado y el potencial de la aguja.

Una característica que cabe destacar sobre este gráfico: cómo el ratio es mayor cuando utilizamos las condiciones de ionización más suaves, es decir cuando la temperatura y el potencial son los menores. Esto significa que el pico predominante es el de la muestra (barbitúrico), teniendo una acidez mayor que la de la referencia (328,3 kcal mol⁻¹). Exactamente el fenómeno opuesto tenemos cuando se emplean las condiciones de ionización más severas.

Obviamente, el uso de un potencial de ionización mayor implica una transmisión de energía mayor al dímero, lo cual repercute en un aumento de la temperatura efectiva [94] (figura 18).

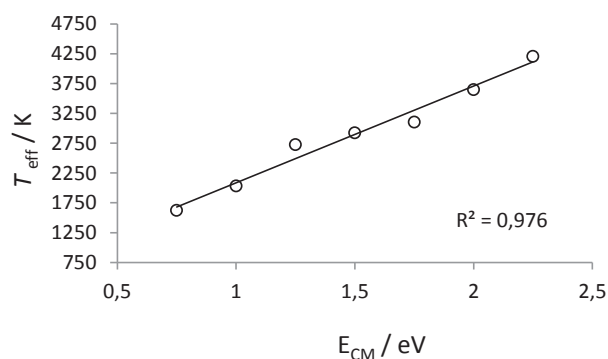


Figura 18. Temperatura efectiva, T_{eff} , a diferentes valores de energía de colisión para el barbitúrico y sus referencias unidas por el N.

En la figura 19 se muestra la diferencia entre energías de Gibbs para los aniones de barbitúrico desprotonados en el carbono y en el nitrógeno, en función de la temperatura efectiva. Estos datos se han obtenido tanto para agua como para fase gas, calculados al nivel de teoría B3LYP/6-311+G(*d,p*). Como se puede observar, a temperatura ambiente el anión desprotonado en el carbono C5 es más estable que el correspondiente en el N. Sin embargo cuando la temperatura se incrementa esta diferencia se hace menor, llegando incluso a invertirse la tendencia para temperaturas superiores a 2900 K en agua y 5457 K en fase gas.

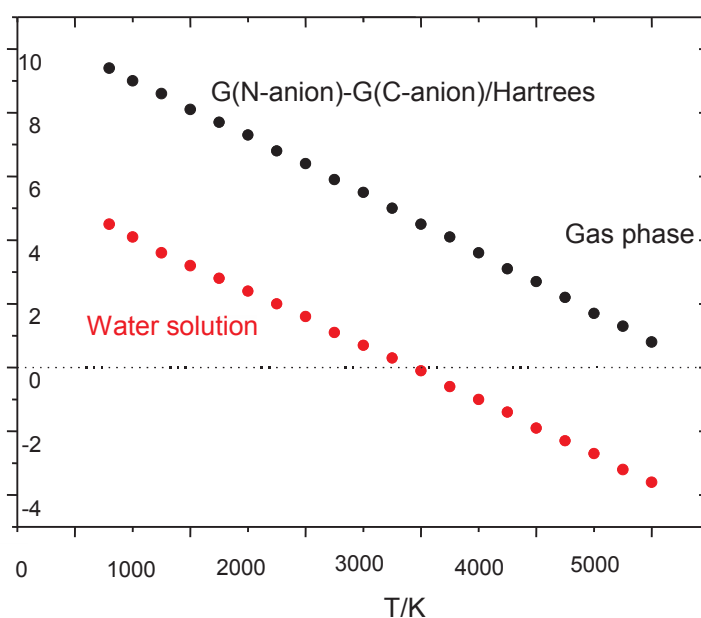


Figura 18. Diferencia en la energía libre de Gibbs entre el ácido barbitúrico desprotonado en el carbono y en el nitrógeno versus la temperatura local o temperatura efectiva.

4.1.2.5 Resultados

Para determinar de forma experimental la *GA* de cada uno de los compuestos a estudio, se seleccionaron cuatro sustancias como referencias (tabla 2) para cada una. Todos los experimentos fueron representados en sus correspondientes gráficas termocinéticas (figura 19). Para la fragmentación se emplearon siete energías en el centro de masas que varían desde 0,75 hasta 2,25 eV.

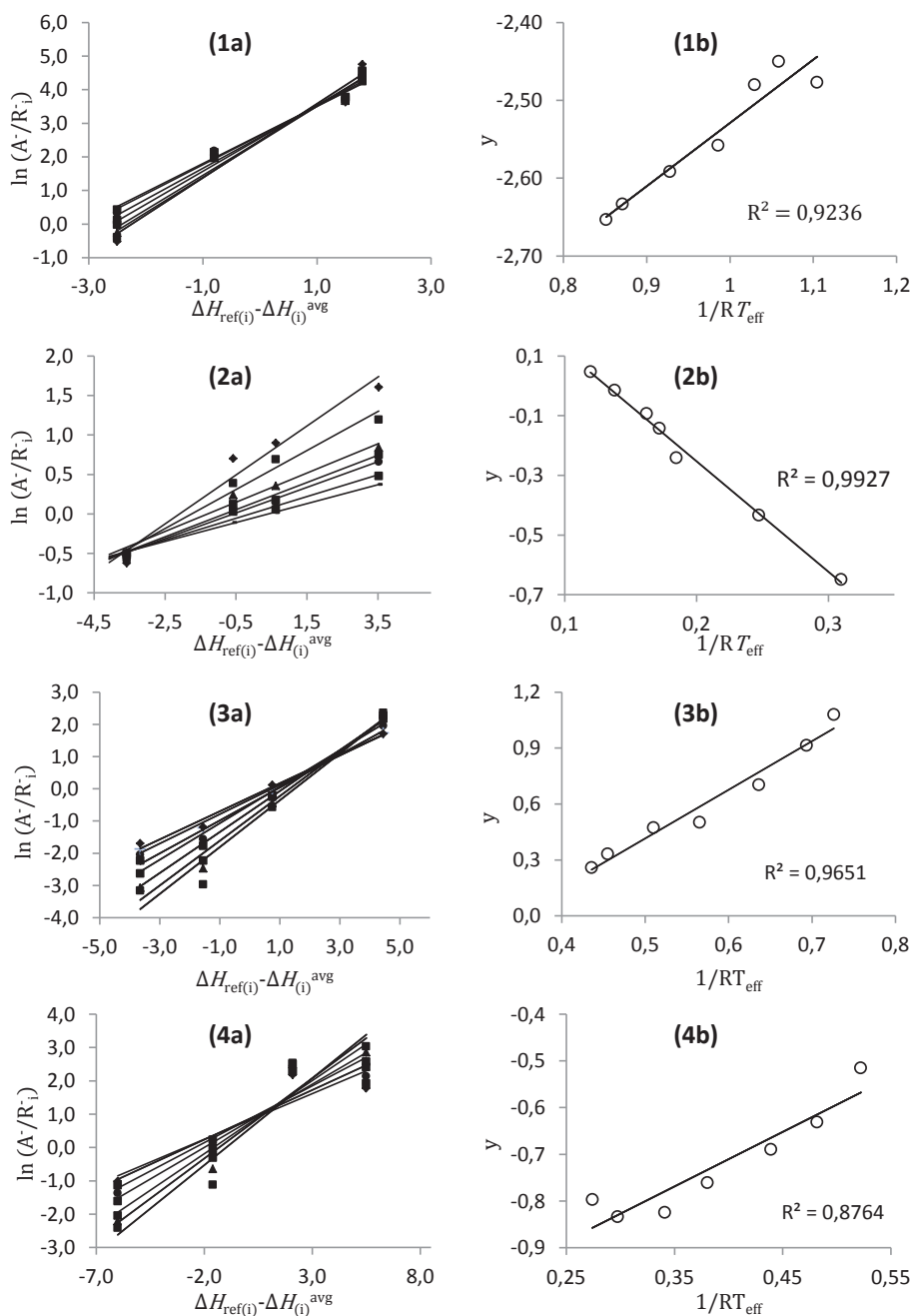


Figura 19. Gráficos EKM para las ureas estudiadas (1-C), (1-N), (2) y (3). a) El conjunto de rectas corresponden a las fragmentaciones CID de los heterodímeros $[A \cdot H \cdot A_{\text{ref}(i)}]$ a siete energías de colisión (0,25-2,25 eV). b) Gráfica de las intersecciones $y = (\Delta H_{\text{ref}(i)} - \Delta H_{\text{ref}(i)}^{\text{avg}})/RT_{\text{eff}} - \Delta(\Delta S)/R$ versus las pendientes $1/RT_{\text{eff}}$.

Compuesto de referencia	$\Delta_r G^{\circ(a)}$ kJ/mol	$\Delta_r H^{\circ(a)}$ kJ/mol	$\Delta_r S^{\circ(b)}$ J/mol·K
Ácido Trifluoroacético ¹	1328.9 ± 8.4	1355.7 ± 12.0	90.0 ± 8.4
Ácido Salicílico ¹	1330.6 ± 8.4	1362.8 ± 9.2	99.7 ± 8.4
4-Nitrofenol ^{1,2,3}	1343.5 ± 8.4	1372.4 ± 8.8	97.1 ± 8.4
Ácido 4-nitrobenzoico ¹	1344.4 ± 8.4	1373.7 ± 9.2	98.4 ± 8.4
4-Nitro-5-metilfenol ³	1350.7 ± 8.4	1381.2 ± 8.8	102.6 ± 8.4
Ác. 3-triflurometilbenzoico ^{2,3}	1361.6 ± 8.4	1390.9 ± 8.8	98.4 ± 8.4
Ácido 3-clorobenzoico ¹	1374.1 ± 8.4	1403.4 ± 8.8	98.4 ± 8.4
Ácido 4-hidroxibenzoico ^{2,3}	1377.0 ± 8.4	1406.4 ± 8.8	98.4 ± 8.4
Ácido 2-tercbutilbenzoico ¹	1378.7 ± 8.4	1408.4 ± 9.2	99.7 ± 8.4
Ácido 2-metilbenzoico ²	1390.4 ± 8.4	1420.6 ± 9.2	101.3 ± 8.4

Tabla 2. Valores termoquímicos en fase gas de las referencias utilizadas como ácidos para determinar la acidez en fase gas de las ureas cíclicas. a) Valores de referencia obtenidos del de la base de datos online del NIST[95]. b) Derivado de la ecuación fundamental de la termodinámica: $\Delta_r G^{\circ} = \Delta_r H^{\circ} - T\Delta_r S^{\circ}$, donde $T = 298$ K. Las incertidumbres de $\Delta_r S^{\circ}$ se asumen como $8,4 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Los números corresponden a: 1) ácido barbitúrico, 2) ácido 5,5-dimetilbarbitúrico, 3) barbital.

Los resultados finales encontrados en la realización de los experimentos se resumen en la tabla 3 así como sus desviaciones estándar.

	ΔH_{acid}	$\Delta S_{acid}^{(a)}$	$\Delta G_{acid}^{(b)(c)}$	G3	G4
Ácido Barbitúrico (C)	327,1±2,4	29,6±2,0	318,3±2,4	318,5	319,0
Ácido Barbitúrico (N)	332,1±2,5	22,7±2,0	325,3±2,5	326,1	327,4
Barbital	334,1±2,1	23,7±2,0	327,0±2,1	326,9	326,6
5,5-Dimetilbarbitúrico	335,0±2,1	25,9±2,0	327,2±2,1	327,8	327,2

Tabla 3. Resultados resumidos para cada urea. a) Todos los valores vienen dados en kcal mol^{-1} , excepto la entropía, la cual viene dada en $\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. b) ΔG_{acid} se obtuvo con la ecuación $\Delta G_{acid} = \Delta H_{acid} - T\Delta S_{acid}$, donde $T = 298$ K. c) Las incertidumbres son calculadas como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las desviaciones.

El resultado de GA en el N para el barbitúrico concuerda con los hallados para las moléculas modelo con el C5 bloqueado. Sin embargo, este valor es ligeramente más ácido que los de barbital y 5,5-dimetilbarbitúrico. Este detalle podría venir dado por la influencia del dímero aún presente parcialmente, unido por el carbono.

4.1.2.6 Conclusiones

Todos los resultados obtenidos mediante el método EKM están en concordancia con los resultados obtenidos mediante teorías G3 y G4 de cálculos ab initio. En el caso del ácido barbitúrico, con dos centros ácidos, se pudo determinar la GA en ambos siguiendo la metodología previamente publicada por nuestro grupo [27]. En el presente caso, la modificación del gas de secado no fue suficiente para aislar el dímero unido por el nitrógeno. Fue necesario además incrementar el potencial de la aguja del electrospray.

Los resultados que se obtuvieron arrojan luz sobre los ya publicados en el NIST, los cuales hacen referencia a la acidez en el nitrógeno. Como confirmación experimental, se seleccionaron dos moléculas semejantes con el C5 dialquilado como modelos de estudio.

4.1.3 Caracterización termoquímica del paracetamol

4.1.3.1 Introducción

Un buen ejemplo de la utilidad del método EKM (apartado 4.1) es este trabajo. Gracias al empleo de un espectrómetro de masas TQ/MS 320 y al método EKM se pudo determinar con bastante precisión los valores de GA y GB.

El paracetamol, N-(4hidroxifenil) acetamida (figura 20) es probablemente uno de los compuestos químicos con fines médicos más versátiles y usados en el mundo. Entre sus aplicaciones se encuentran: analgésico, antiinflamatorio y antipirético.

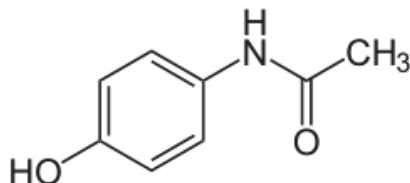


Figura20. Estructura del paracetamol.

Las propiedades del paracetamol neutro han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, la literatura no recoge cuantificación de su reactividad química por transferencia protónica, ni tampoco de las estructuras relacionadas.

Los resultados fueron racionalizados usando cálculos B3LYP con bases 6-311+G(d,p) y 6-311+G(3df,2p).

4.1.3.2 Resultados

En la tabla 4 se resumen los resultados hallados para la *GA*, *GB* y *PA* (afinidad protónica) del paracetamol, tanto experimentales como computacionales.

		Calculados con B3LYP	
	Experimental	6-311++G(d,p)	6-311++G(3df,2p)
Valores de GA			
$\Delta_{\text{acid}}G^0(\text{GA})$	$1404.7 \pm 8.8^{\text{d}}$	$1407.8^{\text{a,d}}$	$1412.9^{\text{a,d}}$
$\Delta_{\text{acid}}H^0$	$1430.3 \pm 8.8^{\text{d}}$	1436.3^{d}	1440.7^{d}
$\Delta_{\text{acid}}S^0$	$86.2 \pm 8.4^{\text{c}}$	$96.2^{\text{b,c}}$	$93.2^{\text{b,c}}$
Valores de GB			
$\Delta_{\text{p}}G^0(\text{GB})$	$869.9 \pm 8.4^{\text{d}}$	$864.6^{\text{a,d}}$	$868.5^{\text{a,d}}$
$\Delta_{\text{p}}H^0(\text{PA})$	$909.4 \pm 8.4^{\text{d}}$	896.7^{d}	902.6^{d}
$\Delta_{\text{p}}S^0$	$132.8 \pm 8.4^{\text{c}}$	$107.5^{\text{b,c}}$	$114.6^{\text{b,c}}$

Tabla 4. Parametros termoquímicos de desprotonación y protonación obtenidos mediante EKM para el compuesto de estudio. ^a Determinado mediante la expresión $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$. ^a kcal/mol. ^b Calculado teniendo en cuenta la población de confórmers neutros e iónicos. ^c cal·mol⁻¹·K⁻¹. ^d kJ·mol⁻¹.

4.1.3.3 Conclusiones

Cabe destacar la alta consistencia entre los resultados experimentales y computacionales. En ambos casos se determinaron valores de energía libre de Gibbs, entalpías y entropías de los procesos de protonación y desprotonación.

Los resultados computacionales mostraron una clara preferencia del protón por el oxígeno del carboxilo.

4.1.4 La sorprendente acidez intrínseca (*GA*) de complejos amino-boranos

4.1.4.1 Introducción

En este caso la determinación de *GA* fue llevada a cabo sobre una serie de moléculas con especial interés tecnológico. Estos compuestos fueron sintetizados por el grupo del profesor Jean-Claude Guillemin [96], del departamento de ciencias

químicas en la Escuela Superior Nacional de Química de Rennes, Francia. Los complejos amino-boranos son moléculas resultantes de la unión de una amina R_nNH_m y un borano del tipo BH_3 . La característica que las hace atractivas tecnológicamente es la posibilidad de generar una molécula de H_2 al estar en contacto con una especie que actúe como ácido.

La basicidad de una amplia variedad de aminoboranos fue determinada previamente por nuestro grupo [97].

4.1.4.2 Resultados

En el caso que nos atañe, la acidez, ocurre otro hecho significativo: la pérdida de un protón desde el nitrógeno lleva a un aumento significativo en la energía del orbital HOMO del sistema y un incremento en su capacidad para donar carga electrónica. La cesión del par de electrones del nitrógeno hasta el orbital 2p vacío del boro produce una fuerte polarización del enlace entre ellos con una contribución del 82 % de los orbitales híbridos del nitrógeno. También se observa un incremento en la participación de los orbitales híbridos del boro (del 18 al 24 %) así como de la participación del orbital s. Consecuentemente, la pérdida de un protón en el nitrógeno aumenta la fortaleza del enlace N-B, lo que se ve reflejado en el valor del índice Wiberg y de la densidad electrónica.

Se llevaron a cabo medidas experimentales de GA para todos los complejos excepto para el amonio-borano, ya que este método no funciona bien con ácidos tan débiles como el amonio. Los valores mostrados en la siguiente tabla están referidos a la pérdida del protón del nitrógeno en todos los casos.

Amina	Amina libre		Amino-borano		$\Delta\Delta$
	$\Delta G^0_{\text{acid}} / \text{kJmol}^{-1}$		$\Delta G^0_{\text{acid}} / \text{kJmol}^{-1}$		
	Exptl. ^a	Calc	Exptl.	Calc. ^b	
Amonio	1656.8	165	-	1462.1	195
Metilamina	1651±1	165	1461.0	1462.4	193
Dimetilamina	1623±8	162	1457.9	1453.7	168
Alilamina	-	161	1443.7	1444.2	172
Ciclopropilamina	-	161	1440.5	1447.3	171
Bencilamina	-	158	1436.7	1438.1	150
Aziridina	-	160	1443.4	1435.5	167
Propargilamina	-	160	1432.1	1431.1	177
Trifluoroetilamin	-	157	1405.0	1400.5	178
Anilina	1502±8	150	1365.7	1360.3	146

Tabla 5. Valores de GA experimentales y calculados en G4 tanto para las aminas libres como para los complejos aminoboranos. $\Delta\Delta G^0_{\text{acid}} [\text{kJ mol}^{-1}]$ es el incremento de acidez de la amina en relación al aminoborano. ^aValores tomados de w. ^b Los valores entre paréntesis han sido obtenidos al nivel B3LYP/6-311+G(3df,2p)//B3LYP/6-31+G(d,p).

Existen dos casos excepcionales en este estudio: el trifluoroaminoborano y el bencilaminoborano. En estos dos casos los resultados computacionales muestran una mayor estabilidad cuando el protón se pierde del grupo borado (22 y 15 kJ mol^{-1} respectivamente). Sin embargo, el dato computacional que se acerca más a los valores experimentales corresponde con la pérdida del protón de la amina. Esta dicotomía se explica mediante un estudio computacional más profundo.

El anión más estable (estructura C, figura 21) corresponde a la descomposición de la molécula en sus componentes básicos: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2 + \text{NH}_2\text{BH}_2$, resultado de la ruptura del anión desprotonado en el boro (B). Esta reacción de descomposición lleva asociada una barrera de 100 kJ mol^{-1} (TSBC). Sin embargo, la desprotonación directa en el boro para alcanzar el producto de partida en esta reacción es 300 kJ mol^{-1} menos favorable que la desprotonación de la amina (A). Se encontró que esta pauta es común para el resto de amino-boranos investigados en este trabajo. Se puede observar también una transferencia protónica desde el grupo BH_3 hasta el nitrógeno desprotonado; este camino conlleva un nuevo estado de transición de 228 kJ mol^{-1} (TSAC). En cualquier caso, se pierda el protón vía nitrógeno o vía boro, alcanzar la estructura más estable (descomposición) requiere superar barreras energéticas bastante elevadas.

4.1.4.3 Conclusiones

La unión de las aminas con BH_3 lleva a un aumento significativo de sus valores de GA (entre 146 y 195 kJ mol^{-1}) lo que supone un aumento en la constante de ionización de 15 órdenes de magnitud o más. Los resultados encontrados son comparables con acideces como la del ácido oxálico o salicílico (fase gas) y más fuertes que ácidos tan representativos como el fórmico o acético.

El análisis de los reordenamientos electrónicos resultó en una mayor fortaleza en los aniones que en sus correspondientes moléculas neutras gracias al trasvase de carga desde el nitrógeno a un orbital 2p vacío del boro.

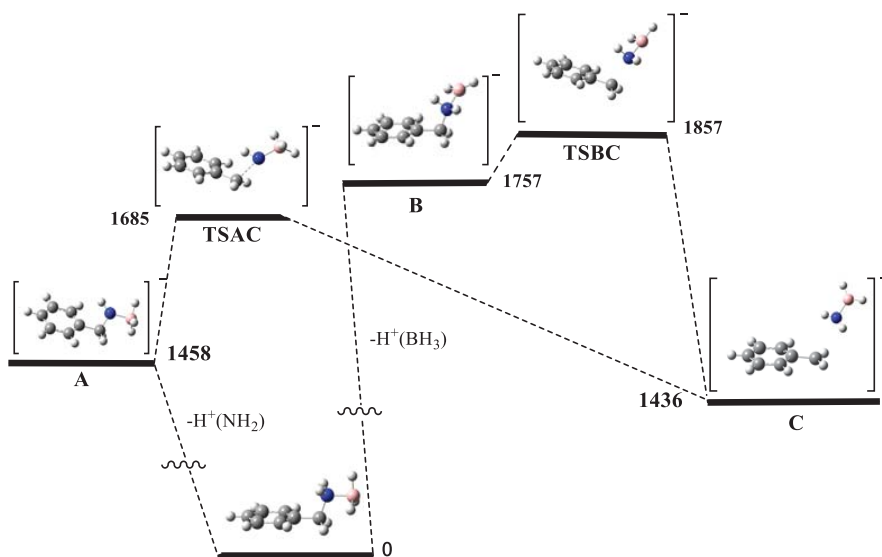


Figura 21. Perfil energético del proceso de desprotonación en NH_2 y BH_2 para el bencilaminoborano. Lo valores mostrados están en kJ mol^{-1} .

4.1.5 Estudio de *closo*-1-COOH-1,7- $\text{C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{11}$ y derivados aminoácidos

4.1.5.1 Introducción

Este tipo de estructuras, cuyo estudio está en auge en la última década gracias a sus múltiples aplicaciones, son de síntesis. En el presente trabajo se estudia la GA y acidez en disolución tanto experimental como computacional del carborano llamado *closo*-1-COOH-1,7- $\text{C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{11}$. La síntesis de este compuesto fue realizada por el profesor

Josef Holub, del Instituto de Química Inorgánica de la Academia de las Ciencias de la República Checa. Dada la similitud espacial entre la caja borada y el equivalente con benceno, y la importancia de los aminoácidos en su conjunto, se decidió acometer un estudio más amplio incluyendo los derivados orto, meta y para de los aminoácidos correspondientes con la fórmula: 1-COOH-*n*-NH₂ (figura 22).

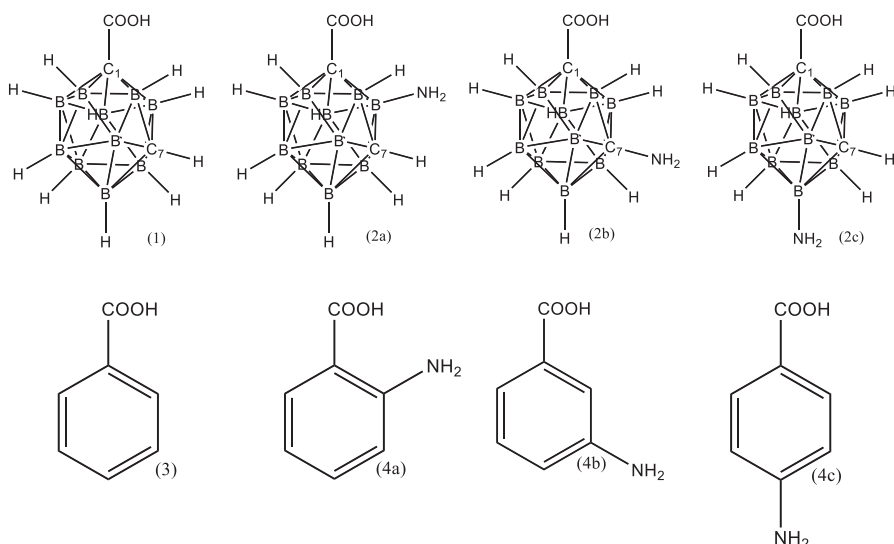


Figura 22. Carboranos y amino ácidos derivados estudiados en este trabajo y sus correspondientes estructuras análogas con carbono.

4.1.5.2 Resultados

Los resultados computacionales fueron obtenidos al nivel B3LYP/6-311++G(d,p). Para el cálculo de pK_a se empleó el modelo SMD [98].

Estructura	ΔG teor. ^a	ΔG exp. ^a	pK _a teor.	pK _a exp.
1	1324,3	1325,1±8,8	1,88	2,00
3	1386,3	1393,7±8,4	5,96	4,2

Tabla 6. Resultados experimentales y computacionales para el *closo*-1-COOH-1,7-C₂B₁₀H₁₁ y el ácido benzoico. ^a kJ mol⁻¹.

Cabe destacar sobre los resultados encontrados como al comparar los valores de GA y pK_a del carborano principal con los valores homólogos del ácido benzoico, se aprecia una acidez mucho más débil para el segundo, particularmente en fase gas. La diferencia encontrada en la GA de 66 kJ mol⁻¹ entre el carborano y la correspondiente

estructura de carbono, es enorme, del orden de al menos 12 órdenes de magnitud en términos de constante de ionización.

Dada la importancia que juegan los procesos de ácido-base en los medios biológicos, donde el agua es el disolvente, pensamos que podría ser relevante conocer cuáles son los valores de pK_a de los aminoácidos derivados de la estructura poliédrica borada. Así pues se llevaron a cabo cálculos computacionales de las estructuras orto, meta y para de los amino ácidos 2a, 2b y 2c (figura 23).

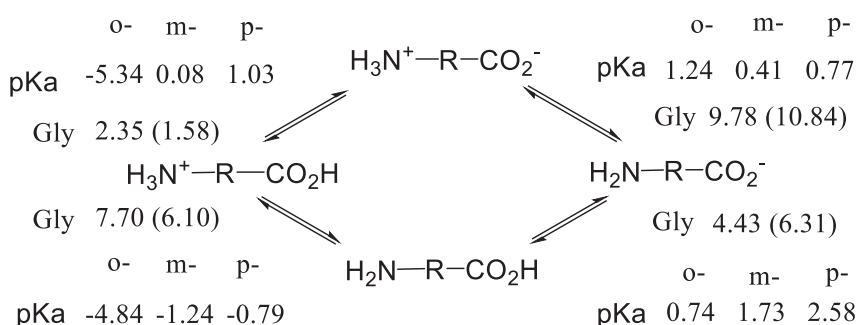


Figura 23. Equilibrio de protonación y desprotonación de las estructuras nombradas como 2a, 2b y 2c y sus valores de pK_a a 298.15 K. Se presentan los valores experimentales (y computacionales) para la glicina (Gly). Los cálculos fueron llevados a cabo con B3LYP/6-311++G(d,f) y SMD como modelo de solvatación.

El mismo proceso se realizó con las estructuras derivadas del benzoico (figura 24). Al igual que ocurre con las estructuras sin el grupo amino, se encuentra unos valores de pK_a mucho menores en aquellos aminoácidos boro derivados.

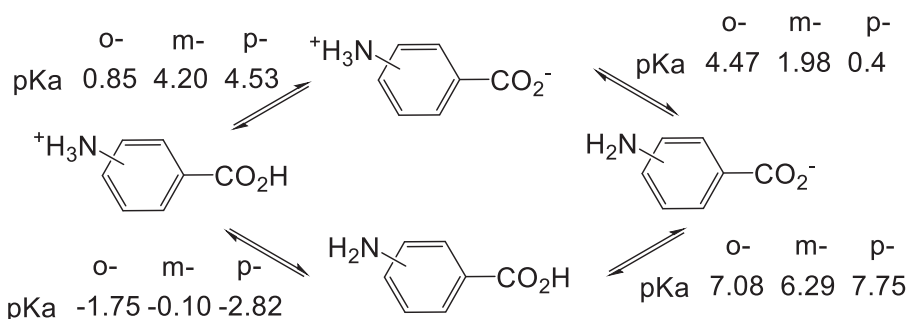


Figura 24. Equilibrio de protonación y desprotonación de las estructuras nombradas como 4a, 4b y 4c y sus valores de pK_a a 298.15 K y sus valores computacionales de pK_a a 298.15 K. Los cálculos fueron llevados a cabo con B3LYP/6-311++G(d,f) y SMD como modelo de solvatación.

4.1.5.3 Conclusiones

Gracias al estudio computacional llevado a cabo para conocer los pK_a se aprecia un carácter ácido mucho mayor en las moléculas “tridimensionales” con esqueleto de boro. Esta propiedad se repite también en las estructuras con amino ácidos. El hecho de que la electronegatividad (Pauling) de los átomos de B, H y C aumenta en ese orden, hace que el comportamiento de los carboranos sea totalmente distinto al de los compuestos orgánicos: la carga formal del hidrógeno en los carboranos es negativa [con distribución tipo $B(\delta^+)-H(\delta^-)$], mientras en los orgánicos por lo general es positiva. Esta particularidad le confiere a los carboranos propiedades específicas como la hidrofobicidad de las capas BH y el carácter ácido de sus vértices CH.

4.2 Estructura y energética

En el bloque anterior se describen los trabajos realizados relativos a la acidez-basicidad de moléculas con intereses diversos. Dentro de la química en fase gas, estos son los procesos más simples en lo que a la formación y/o destrucción de enlaces se refiere, ya que el factor es la transferencia de un protón. Sin embargo, dentro de esta química, se puede ir un paso más allá al hablar del efecto que produce la estructura molecular sobre, por ejemplo, disociaciones unimoleculares. Si bien es cierto que muchas reacciones químicas dependen del entorno que rodea a los reactivos, la estructura que los conforma es decisiva en tales reacciones.

Para estudiar estas estructuras y/o reactividades, nuestro grupo emplea la espectrometría de masas como técnica instrumental. No obstante, dentro de este contexto es habitual tener la necesidad de complementar los resultados mediante otras técnicas experimentales: NMR, IR, etc. Por esta razón en los estudios descritos en el presente apartado aparecen colaboraciones con otros grupos que complementan y enriquecen los trabajos mediante otras técnicas.

4.2.1 Estudio estructural del complejo cloroquina-plata

4.2.1.1 Introducción

Los fármacos antimaláricos tienen una larga historia desde el descubrimiento de la quinina hasta la cloroquina. La patente de este último se asigna a los laboratorios Bayer en 1934. Sin embargo, muchos años más tarde el interés en la cloroquina sigue vigente [99, 100].

La forma más habitual de encontrar este medicamento es como difosfato de cloroquina. Han sido numerosos los esfuerzos por mejorar la efectividad del fármaco. Una vía muy empleada es unirlo a cationes metálicos como Ag(I), Co (II) y Cu (II) [101, 102]. El trabajo actual presenta un estudio estructural del complejo cloroquina plata (CQ-Ag). Los compuestos que aquí se estudian y que pueden verse en la figura 25 fueron sintetizados por la Profesora Ana Valderrama de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería de Lima, Perú. En este trabajo se lleva a cabo una caracterización estructural del complejo formado por cloroquina y un átomo de plata.

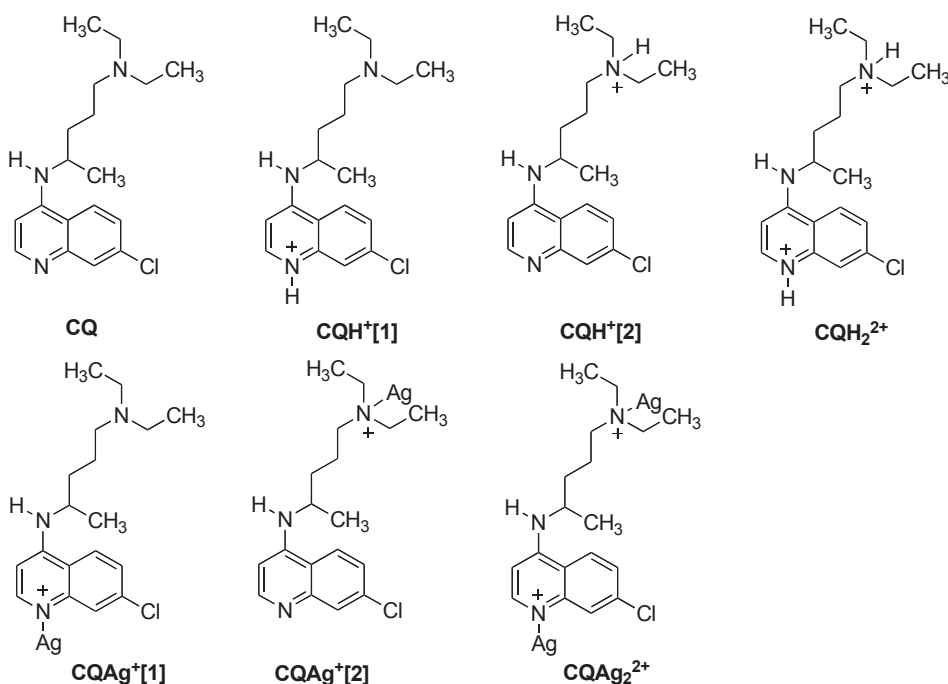


Figura 25. Los siete compuestos han sido estudiados computacionalmente. Las estructuras [1] y [2] corresponden a los compuestos en los cuales el protón o la plata se unen a la quinolina en el N sp² y al N del dietilamino sp³ respectivamente.

4.2.1.2 Resultados

Dada la imposibilidad de cristalizar el complejo y así caracterizarlo mediante XRD, se decidió emplear otras técnicas: cálculos DFT, análisis elemental, conductividad molar, FTIR, NMR y FT-ICR-MS.

Entre los resultados complementarios a la caracterización por MS cabe destacar los encontrados por el grupo de la Profesora Rosa M. Claramunt de la Universidad Nacional de Educación a Distancia mediante NMR.

Se encontró, por análisis elemental, que la estequiometría del complejo es 1:1 y, dado que el catión Ag^+ debe estar dicoordinado, aparecen tres estructuras posibles para $\text{CQ}_2\text{Ag}_2^{2+}$: i) un dímero (Dim) que implica la unión de dos moléculas de cloroquina por átomos de nitrógeno sp^2 y sp^3 ii) Cat-hd, estructura lineal en la que se unen dos moléculas asimétricamente (cabeza-cola) y iii) Cat-hh, en la que aparece formando un dímero lineal simétrico unido por ambas “cabezas”.

Espectrometría de masas ESI-FT-ICR

En espectrometría de masas las muestras han de ser disueltas, de forma que el compuesto encontrado mediante NMR, $\text{CQ}_2\text{Ag}_2^{2+}$, presente en el sólido, desaparece. Este hecho está en concordancia con lo encontrado en espectrometría de masas, donde se aprecian los siguientes picos principales (>40%): cloroquina protonada CQH^+ (m/z 320,1), plata-cloroquina (m/z 428,1) y cloroquina plata cloroquina CQ_2Ag^+ (m/z 743,7).

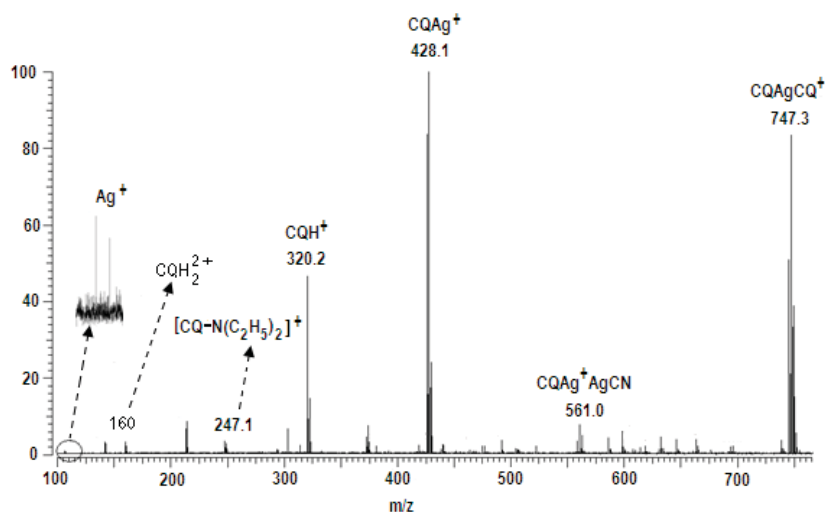
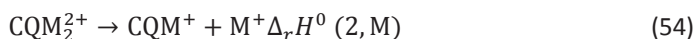


Figura 26. Espectro de masas correspondiente al compuesto CQAg en DMSO 100 $\mu\text{g/mL}$.

Por debajo de m/z 320 aparecen pequeños picos correspondientes a la descomposición del compuesto en disolución.

Cálculos DFT

Con el fin de explicar estos resultados, se llevaron a cabo cálculos DFT adicionales en fase gas. Se calcularon las primeras y segundas afinidades electrónicas como las entalpías correspondientes a las reacciones siguientes:



La afinidad protónica (PA) de la cloroquina en el nitrógeno sp^3 de la quinolina es prácticamente igual similar a la PA del grupo dietilamino sp^2 (tabla 7).

	CQ		CQM ⁺ [1]	
Site	Proton affinity PA_a	Ag-cation- affinity a	2 ^a PA^a (M = H) ^b	2 ^a MA^a (M = Ag) ^b
quinoline sp^2 N, [1]	1017,8	207,6		
diethylamino sp^3 N, [2]	1009,8	229,5	797,4	49,2

Tabla 7. Afinidades protónicas y con plata de la cloroquina en fase gas. ^a kJ mol^{-1} , ^b definido por la ecuación 53.

Nuestros resultados revelan que ambos sitios son los más básicos de la molécula, siendo también los sitios preferentes de unión de la plata. Por otra parte, la afinidad de la molécula por el metal, es mayor en el N sp^3 que en el N aromático. Esto significa que la plata tendría preferencia por unirse en el N de la cadena lateral.

Cabe destacar también la diferencia entre las afinidades por el protón y por la plata. Tanto la primera como la segunda afinidad protónica son mayores que las afinidades por la plata. En relación a esto, al someter el complejo CQM⁺ a disolventes próticos como mezclas de DMSO-Agua, la señal correspondiente al complejo decrece de forma proporcional al ratio de agua.

Se encontró también el pico correspondiente a la cloroquina diprotonada, pero no el homólogo con dos átomos de plata.

4.2.1.3 Conclusiones

A la luz de todos estos resultados, cabe destacar como conclusión principal que el complejo de cloroquina-plata obtenido mediante síntesis se disocia en presencia de disolventes próticos y descompone con cierta facilidad en los orgánicos. La estequiometría del complejo CQAg neutro es 1:1, [CQ:AgNO₃, CQ = cloroquina, C₁₈H₂₆N₃Cl], donde el contraion nitrato está situado fuera de la esfera de coordinación. Los cationes Ag⁺ están dicoordinados a dos moléculas de cloroquina (CQ₂Ag²⁺), preferentemente a través de los sitios más básicos el N sp^2 quinolinico y el N sp^3 del radical dietilamino.

4.2.2 Oligomerización aniónica de Li₂[B₁₂H₁₂] y Li[CB₁₁H₁₂]

4.2.2.1 Introducción

En el apartado 4.1.5 se describe un trabajo relativo a la acidez de moléculas de esta familia. Los heteroboranos poliédricos muestran una gran variedad de arquitecturas moleculares con un amplio abanico de aplicaciones en biociencias [103] y medicina [104]. La gran estabilidad que muestran los compuestos “jaula” los convierten en excelentes candidatos para estudios computacionales y experimentales de interacciones débiles con biomoléculas [105]. La síntesis y la caracterización

estructural de complejos borados con alcalinos, incluyendo los compuestos bajo estudio en este trabajo, podrían ser relevantes para el entendimiento de los mecanismos de reacción en sus interacciones con metales alcalinos. Así pues, la liberación de Li en el interior de un heteroborano podría ser interesante para medicina o ciencia de materiales, como en óptica no lineal (NLO) [106].

En este trabajo se estudia, tanto a nivel experimental como computacional los compuestos $\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$ (I) y $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$ (II) sintetizados por los Drs. Ellis y J. Welch de la Universidad Heriot-Watt de Reino Unido. El trabajo experimental fue realizado con el espectrómetro TQ-FT-ICR Varian 920 MS. En este apartado se determinó experimentalmente la energía de disociación entre el heteroborano y el litio. Computacionalmente los cálculos fueron llevados a cabo con el método híbrido DFT/HF B3LYP [107, 108], el cual se ajustaba muy bien al problema en cuestión. La base utilizada para tal fin fue 6-311++G(d,p).

4.2.2.2 Resultados

El espectro del compuesto I ($\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$) mostrado en la figura 27, a) muestra dos tipos de picos, ambos formados por la adición sucesiva de especies: aniones mono y di cargados (por una o dos pérdidas de Li respectivamente), los cuales fueron asignados a aniones oligoméricos $[\text{I}_n\text{-Li}]^-$ ($n = 1, 2, 3, 4$) y $[\text{I}_n\text{-2Li}]^{2-}$ ($n = 4, 5, 6, 7$), respectivamente (figura 27). En la parte b) de este espectro se aprecia un pico con m/z 71,107 identificado como el ion doblemente cargado $[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]^{2-}$. Cabe destacar la presencia de otras especies, tales como el dímero $[\text{I}_2\text{-Li}]^-$ y trímero $[\text{I}_3\text{-Li}]^-$, aniones monocargados solapados con el tetrámero ($[\text{I}_4\text{-2Li}]^{2-}$) y el hexámero ($[\text{I}_6\text{-2Li}]^{2-}$) dicargados, respectivamente.

CID con resolución de energías

Los experimentos de disociación fueron llevados a cabo únicamente sobre el compuesto II ya que fue imposible aislar el compuesto I de sus oligómeros. La energía de disociación del enlace, *Bond Dissociation Energy* (BDE) del dímero $[\text{II}_2\text{-Li}]^-$ se obtuvo a partir del correspondiente umbral de disociación, E_0 :



La sección eficaz total de la reacción, σ , se determinó empleando la relación $I_R = I_{tot} \cdot e^{-\sigma \rho l}$, donde I_{tot} y I_R son la intensidad total y la intensidad del fragmento respectivamente, ambos medidos tras la disociación, ρ es la densidad del gas de colisión y l es la longitud (18,5 cm) de la celda de colisión.

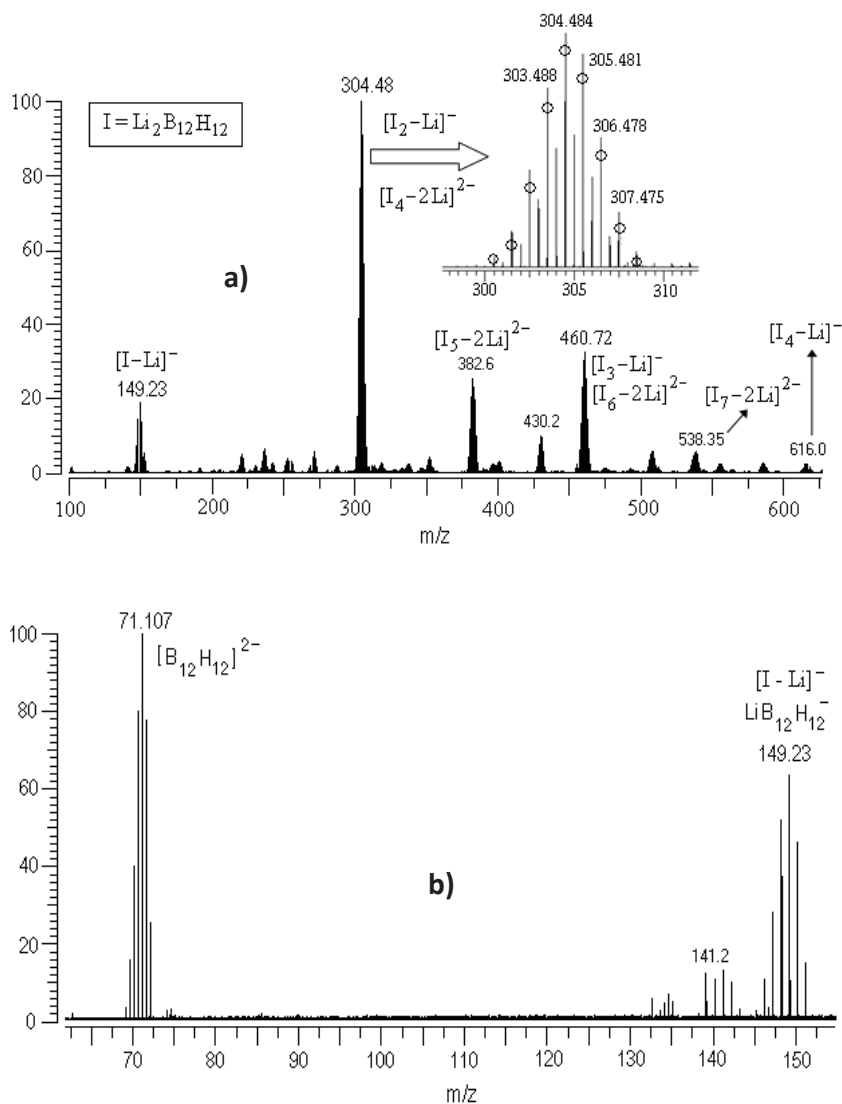


Figura 27. Espectros de masas ESI-FT-ICR de $Li_2[B_{12}H_{12}]$ (I) en modo negativo, optimizado para los rangos (a) $100 < m/z < 650$ y (b) $m/z < 160$. La ampliación en b muestra una distribución isotópica del dímero $[I_2 - Li]^-$ (O) y tetrámero $[I_4 - 2Li]^{2-}$.

En la figura 28 se muestra la simulación de σ para la reacción 55 como función de E_{cm} obtenida con el programa L-CID desarrollado por el Chen y col. [109]. La energía

de disociación extraída de este método fue $E_0 = 1,5 \pm 0,2$ eV. Este resultado concuerda en gran medida con el mismo hallado computacionalmente para la misma reacción a 0 K, $\Delta E_{0K} = 1,54$ eV.

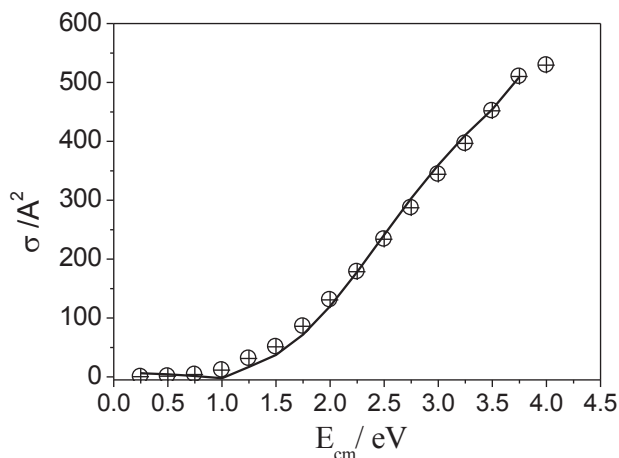


Figura 28. Simulación con L-CID de σ versus E_{cm} para la reacción 9.

Química Computacional

Con la finalidad de arrojar luz sobre las estructuras y mecanismos moleculares que aparecen arriba, se llevaron a cabo cálculos computacionales para determinar las estructuras optimizadas, así como distribuciones de cargas.

En un trabajo previo, se demostró mediante cálculos mecánico-cuánticos que dos átomos de litio no pueden situarse en dos caras contiguas de la estructura en forma de caja del complejo I [110]. Así mismo, se analizaron todos los posibles isómeros procedentes de las combinaciones de tres átomos de litio con dos moléculas de $B_{12}H_{12}$. Los resultados mostraron que la diferencia energética entre todos ellos no era mayor de 10 kcal mol^{-1} (figura 29).

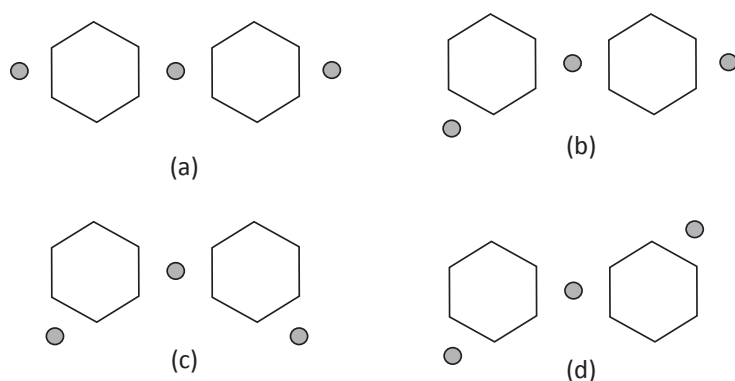


Figura 29. Esquema correspondiente a las estructuras de mínima energía de dos complejos B12H12 y tres átomos de litio.

Otro estudio de interés llevado a cabo computacionalmente, y que no pudo realizarse desde el punto de vista experimental fue el cálculo de la energía de disociación de del dímero $[\text{I}_2 - \text{Li}]^-$.



En cuanto al carborano II, la estructura optimizada mostró en todos los casos que el átomo de litio se sitúa en la cara opuesta a la del carbono (figura 30).

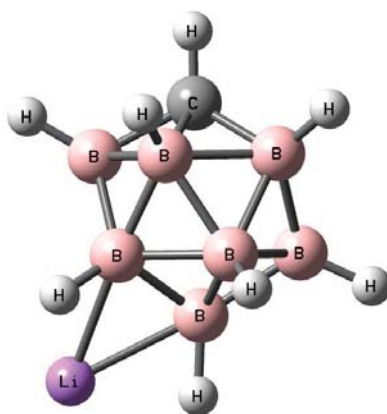


Figura 30. Estructura optimizada del compuesto II ($\text{LiCB}_{11}\text{H}_{12}$) a nivel B3LYP/6-311++G(d,p).

4.2.2.3 Conclusiones

Se realizó un amplio estudio de caracterización estructural tanto experimental como computacional de los compuestos *closo*-(car)boranos litiados $\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$ (I) y $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$ (II). De acuerdo a los resultados experimentales, el dianión $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$ muestra una afinidad por litio mayor que el monoanión con un átomo de carbono.

Se estimó experimentalmente la energía de disociación del Li unido a las cajas icosaédricas $[\text{II}_2\text{-Li}]^+$ encontrando un buen acuerdo con los resultados computacionales: $\Delta E_{0K} = 1,54 \pm 0,2 \text{ eV}$.

El mismo dato, correspondiente a al compuesto I ($[\text{I}_2\text{-Li}]^+$) pudo ser determinada únicamente mediante cálculos computacionales, encontrando: $\Delta E_{0K} = 1,54 \text{ eV}$.

4.2.3 Propiedades estáticas y dinámicas del binol

4.2.3.1 Introducción

1,1'-Binol-2-naftol (Binol) y sus derivados son una de las clases de ligandos más empleados en síntesis asimétrica. Se utilizan en una amplia gama de reacciones, entre las que se encuentran: Diels-Alder, adiciones y reducciones a carbonilos, adiciones de Michael, epoxidaciones y reacciones de Henry. El binol tiene quiralidad axial pudiéndose separar los dos enantiómeros dado que son estables frente a la racemización.

Las propiedades rotacionales ópticas del (R o S) Binol han sido investigadas en disolventes polares y no polares a diferentes valores de pH. Se considera que estos cambios se determinan por el equilibrio entre los confórmeros "*cisoid*" y "*transoid*" del Binol, el cual se relaciona con el cambio en el ángulo diedro entre los dos anillos de naftaleno planos (figura 31).

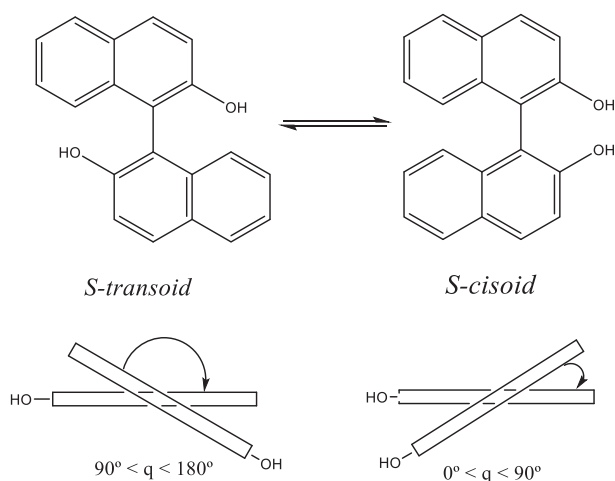


Figura 31. Conformaciones “Cisoid” y “Transoid” del binol.

4.2.3.2 Resultados

Cálculos computacionales

El mecanismo de isomerización del binol se ha estudiado mediante cálculos DFT como parte de la caracterización de sus propiedades estáticas y dinámicas [111]. Se encontraron tres conformeros para el binol, cada uno de ellos con dos enantiómeros.

En el *Cambridge Structural Database* (CSD) se reporta la presencia de tres tipos de moléculas [112]: mezcla racémica R,S(±) o BIRKOC ($\vartheta_{av} = 88.4^\circ$), enantiómero S(-) o UKILAC y enantiómero R(+) o WANNII ($\vartheta_{av} = 76.8^\circ$). De esta manera, en estado sólido, se puede considerar un ángulo medio de 83° para la conformación del Binol.

Se llevó a cabo la optimización de la geometría del binol a cuatro niveles de teoría diferente: i) B3LYP/6-31G(d), ii) B3LYP/6-311++G(d,p), iii) M06-2x/6-311++G(d,p), iv) MP2/6-311++G(d,p). No se encontraron grandes diferencias entre todos los métodos. El isómero ZZ, aquel que tiene los dos protones apuntando hacia el segundo anillo de naftaleno, es el más estable en todos los casos. Para este isómero, en fase gas se encontraron valor de $\theta \sim 105^\circ$

Por otra parte, también se determinaron las barreras de enantiomerización, teniendo en cuenta la complejidad de este proceso, ya que incluye rotaciones sobre el enlace C-C central y la rotación de los grupos OH. Una vez más el isómero ZZ fue el más estable, con una energía de $158,4 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Resultados Experimentales

Una de las propiedades más importante de esta molécula es su acidez en fase gas, ya que la liberación de un protón para formar el anión da como resultado un ligando mono o di dentado. Para llevar a cabo esta medición se aplicó el método EKM descrito previamente (4.1). Los valores para la desprotonación del Binol se derivan de la segunda gráfica: $\Delta_{\text{acid}}H^0 = 1389.8 \pm 8.4 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta_{\text{acid}}S^0 = 107.1 \pm 8.4 \text{ J mol}^{-1}$ y GA $\Delta_{\text{acid}}G^0 = 1357.9 \pm 8.4 \text{ kJ mol}^{-1}$. El valor calculado de $\Delta_{\text{acid}}H_{\text{calc}}^0 = 1388.3 \text{ kJ mol}^{-1}$.

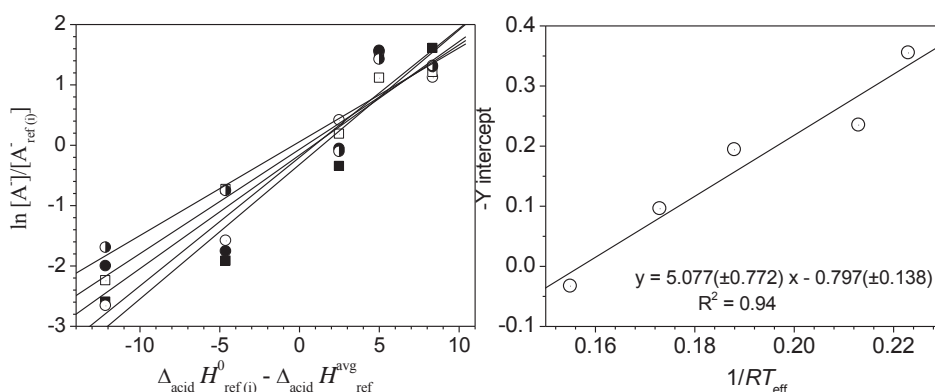


Figura 32. Primera y segunda gráfica termocinética usando los datos derivados de la fragmentación CID de los dímeros de Binol con sus referencias.

4.2.3.3 Conclusiones

Se llevó a cabo un amplio estudio, tanto computacional como experimental de las propiedades estáticas y dinámicas del compuesto 1,1'-Binol-2-naftol (Binol). Cabe destacar la $\Delta_{\text{acid}}H^0 = 1389.8 \pm 8.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ y el ángulo conformacional $\vartheta = 102.4^\circ$, determinados en fase gas mediante espectrometría de masas y espectroscopía de microondas. Las barreras de enantiomerización, conocidas en la literatura solamente para el compuesto neutro, fueron determinadas para las estructuras neutras, y en medio ácido y básico. En conclusión, el Binol en fase gas mantiene una conformación de “*transoid*”($\theta \sim 105^\circ$) mientras que en estado sólido adopta la de “*cisoid*”($\theta \sim 83^\circ$) debido a los efectos del cristal.

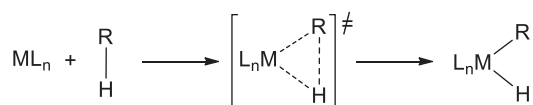
4.2.4 Activación de enlaces C(sp³)-H intramoleculares en complejos de platino sulfonados

4.2.4.1 Introducción

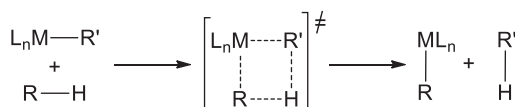
Los complejos organometálicos considerados (figura 33) fueron sintetizados por el grupo del Dr. Ernesto de Jesús de la Universidad de Alcalá. La presencia del ligando aniónico *N*-(alquilsulfonato)-*N'*-(*R*)imidazol-2-ilideno en una serie de complejos (DMSO)dimetilplatino (II) ha posibilitado su estudio mediante espectrometría de masas en ausencia de agentes ionizantes. Nuestros resultados, usando la técnica MS de alta resolución FT-ICR-MS/7T con fuente de fragmentación por IRMPD, revela mecanismos similares de transformación para estos complejos en fase gas; la disociación del grupo DMSO, va seguida de dos activaciones intramoleculares C(sp³)-H con la consecuente liberación de grupos metano CH₄. Los cálculos DFT demuestran que el grupo sulfonato promueve una reacción intramolecular de metalación-desprotonación poco común asistida por la activación de enlaces C-H, transferencia de H⁺ y la consecuente protonólisis de enlaces Pt-Me. Sin embargo, los resultados teóricos también concuerdan con una secuencia particular y un tipo de mecanismos dependiendo de la sustitución del carbeno. Comparado a la reacción clásica de adición oxidativa de enlaces C-H, el camino asistido por bases descrito aquí reduce la energía de activación de Gibbs en 5-7 kcal mol⁻¹.

La activación de enlaces C(sp³)-H por un único sitio en complejos metálicos resulta un campo de investigación con creciente interés debido a que poseen cierto potencial para la transformación de productos primarios hidrocarbonados de bajo coste en productos con valor añadido[113]. Estas reacciones son conocidas por transcurrir a través de diversos mecanismos. Los principales caminos por los que transcurren estas reacciones vienen indicados en el esquema 3:

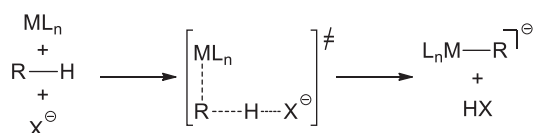
a) Adición Oxidativa



b) Metatesis de enlaces σ



c) Activación eletrofílica de C-H asistida por bases



Esquema 3. Mecanismos de activación de enlaces C-H mediados por complejos metálicos.

Muchos complejos de transición facilitan la ruptura de enlaces C-H. Sin embargo, Shilov y colaboradores [114] reportan en su trabajo que la conversión catalítica de alquenos en alcoholes bajo condiciones suaves, los complejos de Pt tienen una mayor efectividad debido a su facilidad para formar enlaces Pt-H y Pt-R [115-117] a través de los mecanismos descritos arriba [118].

Los compuestos estudiados en este trabajo (figura 33) han sido probados como complejos estables y solubles en agua. Estas disoluciones, bajo condiciones de calentamiento tienen la capacidad de liberar gases. Así pues, los complejos Na[1a-d] en D₂O a 80 °C liberan CDH₃, C₂H₆ y CH₄. Se asume la formación de gases a un mecanismo de deuterólisis competitiva y eliminación reductiva implicando enlaces Pt-Me. Para la formación de metano no deuterado se propone una activación intramolecular C-H. Motivados por estos resultados, ampliamos la investigación para intentar arrojar luz sobre ellos. Los hallazgos en fase gas, mediante FT-ICR-MS y DFT indican que la liberación de metano es una consecuencia de las activaciones de enlaces C(sp³)-H en los N-sustituyentes de los ligandos *N*-heterocíclicos (NHC), en procesos donde el grupo sulfonato remoto juega un papel determinante como base intramolecular asistiendo en la ruta c del esquema n.

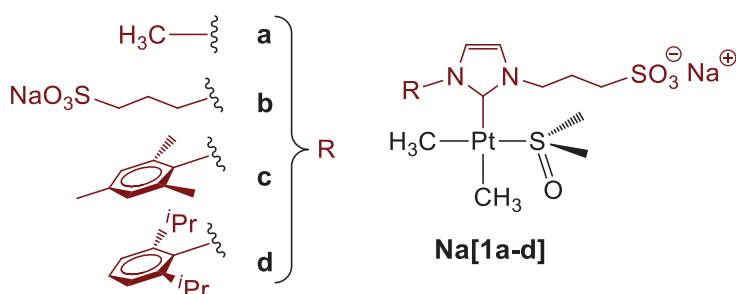
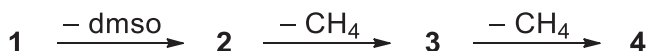


Figura 33. Complejos (NHC)Pt(II) estudiados en este trabajo.

4.2.4.2 Resultados

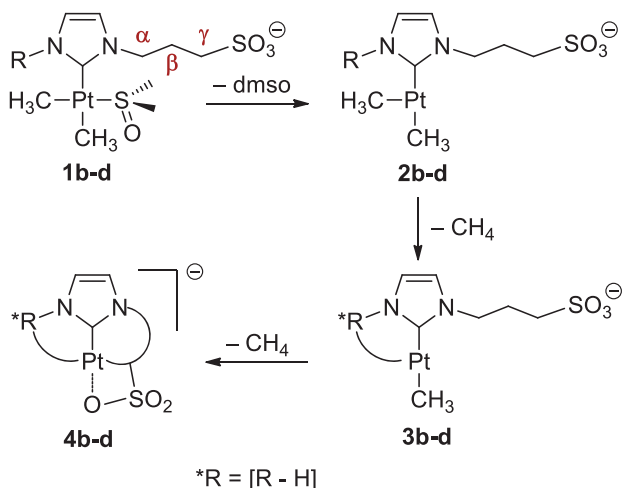
En el esquema 4 se muestra la secuencia de liberación propuesta para estos complejos. En los espectros de ESI-TOF en modo negativo, aparecen los picos correspondientes a los aniones **1a** y **1b** (esquema 5) con intensidades inferiores al 5% mientras que los picos correspondientes a los fragmentos que se forman tras la pérdida de DMSO (aniones **2**) y su consecuente liberación de una o dos moléculas de metano (**3** y **4** respectivamente) son más intensos. De hecho, los correspondientes iones **2** y **3** son los más estables en el espectro para aquellos complejos que contienen sustituyentes alquilo o arilo respectivamente.



Esquema 4. Transformaciones observadas mediante ESI(-) MS para los aniones derivados de la sal Na[1a-d].

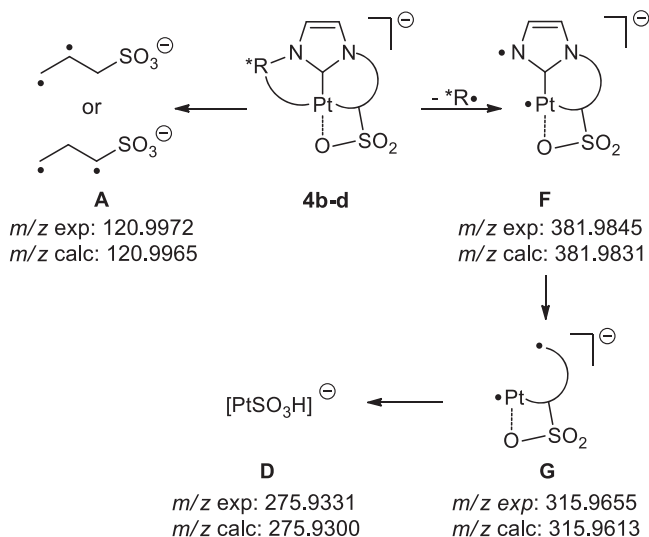
Gracias a la gran precisión y resolución de la técnica FT-ICR, las desviaciones en la m/z de los espectros obtenidos son menores de 8 ppm. Además, la identificación de fragmentos para los aniones **2-4** se verificó mediante fragmentación con IRMPD. La sucesión de transformaciones mostradas en el esquema **4** es corroborada por los espectros así adquiridos, ya que los experimentos para iones puntuales llevan siempre a la detección del mismo grupo de fragmentos derivados de su predecesor. Por ejemplo, se observan los aniones **3** y **4** a partir de la fragmentación del **2** y el **4** a partir del **3**. Los cálculos DFT realizados apoyan el mecanismo descrito anteriormente. Los resultados, tanto experimentales como computacionales ponen de manifiesto la formación en serie de los productos **b**, **c** y **d** a partir del **a** siguiendo el mecanismo

expuesto en el esquema 5. La única excepción a esto es el proceso desde **1a** hasta **4a** y es discutido aparte.



Esquema 5. Secuencia propuesta para la formación de los iones **4b-d** desde el **1b-d** en fase gas.

La caracterización estructural de los iones **4b-d** mediante IRMPD revela un patrón común de fragmentación (esquema 6).

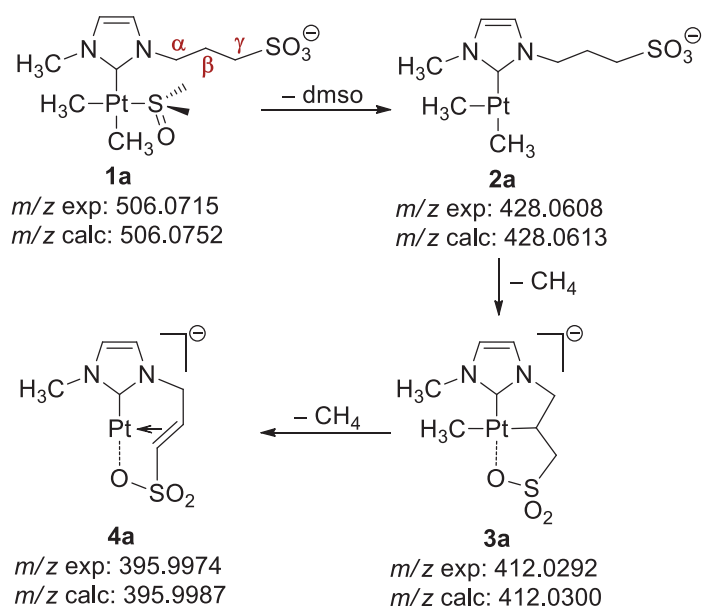


Esquema 6. Iones encontrados y patrón de fragmentación propuesto desde los iones **4b-d**.

La aparición del producto **A** y **F** se explican por la ruptura homolítica de la cadena sulfonada y del sustituyente R* respectivamente. Su detección apoya la presencia de un mecanismo de activación C-H en los ligando NHC. La fragmentación adicional de **F** deriva en la formación de **G**, mayormente a través de la ruptura simultánea de los enlaces Pt-NHC y N-C (cadena sulfonada) el cual a su vez deja un ion **D** a través de un posible mecanismo de β eliminación de un hidruro.

Todos estos procesos se desarrollan mediante activaciones C(sp³)-H en los sustituyentes alquilo y arilo, los cuales, al menos en fase gas, deben producirse de forma intramolecular.

El complejo **1a** experimenta una segunda activación C-H diferente presumiblemente debido a las restricciones de carácter geométricas para formar un ciclo de platino de cuatro miembros con el N-Me. En este caso el producto de la doble activación C-H en fase gas es el complejo π -alquenoplatino (0) **4a** (esquema 7), en el cual ambas activaciones tienen lugar sobre la cadena sulfonada. Esta presunción fue más tarde confirmada por los cálculos DFT y por la fragmentación IRMPD.



Esquema 7. Secuencia propuesta para la formación del ion **4a** a partir del **1a** en fase gas.

Con el fin de establecer si la pérdida de metano para formar **4a** involucra el grupo N-Me o el Pt-Me del precursor **3a**, se preparó el compuesto marcado isotópicamente

Na[¹³C**1a**] con el *N*-Me marcado con ¹³C. En los espectros de masas correspondientes al complejo marcado, se observan los picos correspondientes a las especies con ¹³C para ¹³C**1a**, ¹³C**2a**, ¹³C**3a**, and ¹³C**4a**. La conclusión derivada de estos resultados es que el grupo metilo unido al nitrógeno no interviene la liberación de metano. Son los ligandos metilo unidos al metal quienes reaccionan y generan CH₄. Con el fin de confirmar estos hechos definitivamente, se sometió el complejo a fragmentación mediante IRMPD, apareciendo los mismos picos que para su homólogo sin marcar. En los casos en los que se conservaba el metilo marcado, se apreció una variación de *m/z* de +1 correspondiente al ¹³C.

Cálculos DFT

Para intentar discernir el mecanismo de las transformaciones observadas experimentalmente en fase gas, se llevaron a cabo una serie de cálculos computacionales DFT con el funcional M06 [119].

Según el trabajo de Marrone [120], el mecanismo de disociación del DMSO carece de estado de transición, ya que la reacción opuesta no tiene barrera. Así, se estimaron unos valores de energía en la barrera de tal pérdida correspondiente a (ΔG^0 , 298 K) 12.5 (**1d**). Estos datos explicarían la baja o nula intensidad en la detección de estos iones en el espectro de masas, debido sin duda a la baja energía de activación en estos procesos.

Una vez que se formal el intermedio **2**, el camino hasta llegar al producto **4** depende de los diferentes sustituyentes. El camino más plausible para este proceso se describe gráficamente en la figura 34.

La activación del enlace C-H intramolecular **2d** es, en principio concebible sobre la cadena sulfonada o sobre el anillo de diisopropilfenilo. Los cálculos DFT desvelan la formación de un enlace Pt-O tras la pérdida de metano como forma más estable termodinámicamente. Sin embargo, la activación de un grupo metilo del ligando aromático es más favorable cinéticamente a través de un ciclo con el platino como miembro en una reacción reversible. Esta ciclometalación, según los cálculos se produciría preferentemente vía CMD (*concerted base-assisted metalation-*

deprotonation) y no por adición oxidativa, ya que los valores de las barreras son, respectivamente, 25.3 y 30.1 kcal mol⁻¹.

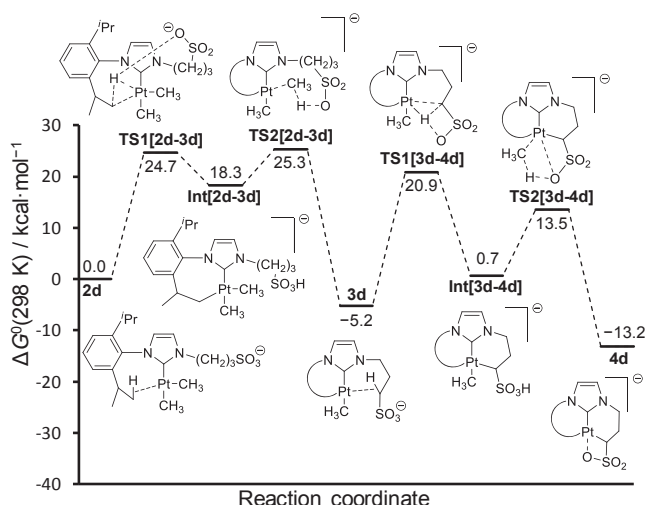


Figura 34. Diagrama de formación de **4d** desde **2d** in fase gas en términos de energía libre de Gibbs. Los intermedios corresponden a complejos σ -CH₄ omitidos por claridad.

Se encontró una energía de activación menor para la protonólisis del enlace Pt-C *cis* entre metal y ligando NHC. Este estado es acompañado con la liberación de una molécula de metano y formación de un intermedio **3d** de Pt (II). De nuevo la interacción mostrada por **3d** resulta en un debilitamiento significativo del enlace C-H y facilita la consecuente ciclometalación llevando al intermedio Int[3d-4d], de nuevo vía CMD C-H asistido por el grupo sulfonato, el cual a su vez, somete a protonólisis al enlace remanente Pt-CH₃ del protón sulfónico para formar **4d**.

4.2.4.3 Conclusiones

En este trabajo se muestra cómo un grupo sulfonato de una cadena lateral puede actuar como base remota y favorecer y apoyar después las activaciones intramoleculares de enlaces C(sp³)-H en complejos (dmso)dimetilplatino (II) de forma concertada y hacerlo con una energía entre 5 y 7 kcal mol⁻¹ más baja que la forma clásica correspondiente a la adición oxidativa. Esta reducción en la barrera de activación implica una aceleración en la reacción de 10⁴-10⁶ veces en términos de la constante de reacción. Nuestra aportación a este trabajo mediante espectrometría de

masas ayudó a entender el mecanismo disociativo y los posteriores cálculos que confirmaban este mecanismo.

El esquema general para el proceso consiste en la pérdida del grupo dimetilsulfóxido, seguido de dos activaciones C(sp³)-H consecutivas con la consecuente liberación de metano. Los cálculos DFT corroboran este mecanismo en sus resultados, pero también revelan que la secuencia y eventos involucrados dependen del tipo de sustituyente en el carbeno. Así, la activación del grupo *orto* en un sustituyente *N'*-arilo está cinéticamente favorecida sobre aquella otra en el *N*-alquilsulfonado, el cual a su vez se activa en un segundo mecanismo CMD formando un ciclo de seis miembros. El último, que tiene lugar primero en ausencia de *N'*-arilo, resulta en un anillo de cinco miembros debido a la mayor flexibilidad conformacional del complejo. Por último, la presencia de un grupo *N'*-metilo restringe la posible geometría en el metalociclo, derivando en la formación de un anillo de cinco miembros favoreciendo la β-eliminación de un hidruro.

Este efecto podría en un principio servir para reducir las duras condiciones de reacción requeridas para este tipo de procesos, activando así un mejor control en la selectividad y tiempos de vida de los catalizadores así como su productividad.

4.2.5 Dinámica de disociación y calor de formación de tetraetilsilano, clorotrietilsilano y diclorodietilsilano.

4.2.5.1 Introducción

Una línea de trabajo establecida desde hace tiempo en nuestro grupo es la investigación de las propiedades químico-físicas de compuestos del grupo XIV [5, 6, 121]. En el presente trabajo se ha estudiado la dinámica de disociación así como los calores de formación de la siguiente molécula (figura 35) mediante la técnica iPEPICO:

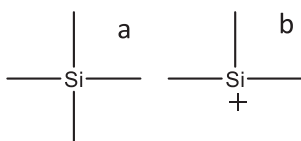
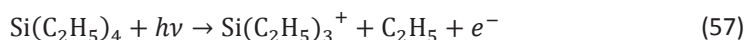


Figura 35. Compuesto de silicio estudiado y sus correspondiente radical catión formado por pérdida de un etilo. ^a Tetrametilsilano, ^b radical catión trimetilsilicio.

La ruta de disociación para esta molécula viene expresada por la siguiente ecuación:



4.2.5.2 Resultados

Esta técnica analiza los fragmentos producidos en la fotodisociación a diferentes energías mediante un TOF. Como se describe en el apartado 2.2.7 el equipo filtra la señal debida a los electrones coincidentes con energía cinética nula de los llamados electrones excitados. Los electrones coincidentes con energía cinética nula corresponden a los cationes generados justo en el umbral de la disociación. Sin embargo, los electrones con $KE \neq 0$ también alcanzan el detector, activando el contador de tiempo para sus correspondientes cationes. Para evitar esta contaminación, a nivel práctico se define un área en el detector alrededor del centro y se sustrae al área correspondiente con los electrones con $KE = 0$.

Las intensidades relativas en tanto por uno de los iones generados para la especie $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ fueron representadas frente a las energías de ionización en el llamado *Breakdown Diagram* o perfil de disociación (figura 36).

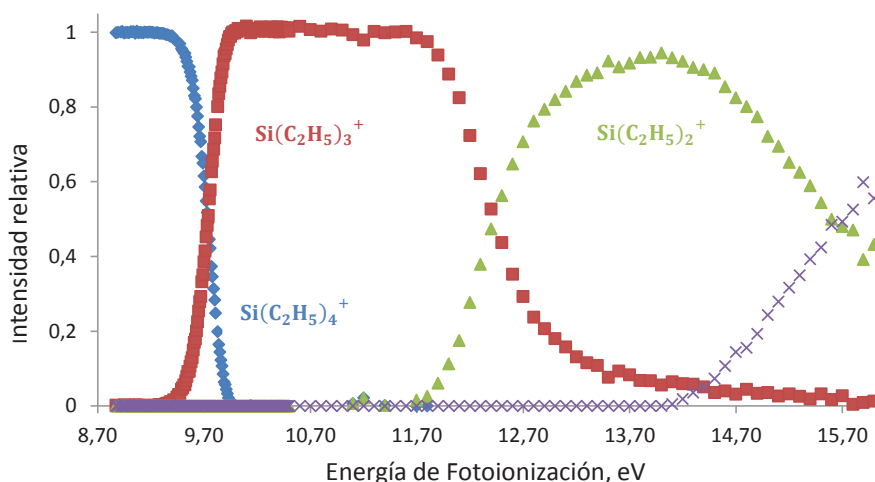


Figura 36. Diagrama de disociación del $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$.

A primera vista se pueden extraer varias conclusiones, a saber: el potencial de ionización de esta especie se sitúa en torno a 8.9 eV, cercano a los 9,0 eV que T. Baer encontró mediante TPEPICO [122]. Cuando aumenta la energía, el precursor comienza a disociarse, llegando a perder completamente uno de los etilos en torno a 10 eV.

La disociación unimolecular es un proceso umbral que ocurre cuando la energía total del sistema (interna más aplicada) es mayor que la de disociación. No obstante, en la gráfica 36 se aprecia como la formación de $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_3^+$ a partir de $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_4^+$ es gradual desde el potencial de ionización hasta 10 eV aproximadamente. Este fenómeno está relacionado con la temperatura, dado que el experimento se realiza a temperatura ambiente, la energía interna del ion sigue una determinada distribución, donde los iones con una energía interna más alta disociarán antes. Conforme la energía aumenta, el resto de iones se van disociando hasta alcanzar el umbral. La disociación no será completa hasta que la suma de la energía aplicada y la energía interna menor supere el umbral de disociación. De ahí la importancia de la distribución térmica en el proceso de disociación.

Para obtener la energía de disociación umbral a 0 K (E_0), se emplea la tasa de disociación, $k(E)$, pero dada la distribución térmica del ion, no existe una única $k(E)$. Para determinar que constante de disociación se ajusta mejor a los datos experimentales, se emplea la teoría cinética RRKM [123].

$$k(E) = \sigma N^\# (E - E_0) / [h\rho(E)] \quad (58)$$

Donde σ es el número de simetría, $N^\#$ es la suma de los estados de transición desde la energía de disociación E_0 a la total E , h es la constante de Planck y $\rho(E)$ es la densidad de estados de las especies disociadas. La teoría consiste en variar $k(E)$ hasta alcanzar el mejor ajuste posible con los datos experimentales. Desde un punto de vista práctico, el ajuste se realiza mediante el programa diseñado por B. Sztáray y A. Bodi [124]. El programa emplea las frecuencias vibracionales y las constantes rotacionales de las especies involucradas, estados de transición incluidos, datos calculados previamente de manera computacional.

Los datos correspondientes a la especie $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ fueron ajustados utilizando el anterior programa, devolviendo un valor de E_0 de $10,070 \pm 0,012$ eV.

Usando la ecuación 20 (apartado 2.2.7.2) se obtuvo una entalpía de formación a 0 K ($\Delta_f H_{0K}^{\circ}$) para el catión $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_3^+$ de $633,6 \pm 1,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, donde Baer encontró un valor de $610 \pm 16 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [122]. Este dato está muy cerca del mismo obtenido computacionalmente: $621,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (G3) y $624,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (G4). En la figura 37 están reflejadas las geometrías más estables del ion (G4), con simetría D_{3h} y de la molécula neutra tetraetilsilano.

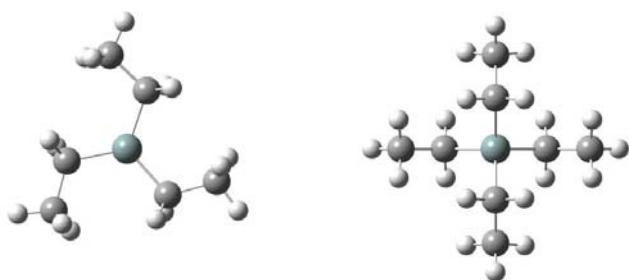


Figura 37. Geometría optimizada a nivel G4 del catión $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_3^+$ y de la molécula neutra $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$. La simetría corresponde a D_{3h} y D_{2d} respectivamente.

Para comprobar la validez del dato correspondiente a la $\Delta_f H_m^{\circ}(\text{g})$ del $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ empleado para determinar $\Delta_f H_{0K}^{\circ}(\text{g})$ del catión, se calculó el mismo dato mediante una reacción isodésmica, y mediante cálculos computacionales a nivel de atomización G3 y G4 (tabla 8). Una reacción isodésmica es aquella en la que los enlaces rotos en los reactivos son los mismos que se forman en los productos [125]. Son empleadas para realizar estimaciones termoquímicas sobre las entalpías de formación de compuestos químicos combinando datos experimentales con datos de energía obtenidos a partir de cálculos teóricos.

Reacción Isodésmica	$\Delta_f H_m^{\circ}(\text{g})$	$\Delta_f H_m^{\circ}(\text{g})$, atomización		$\Delta_f H_m^{\circ}(\text{g})$ exp. ^a
$\text{Et}_4\text{Si} + 4\text{CH}_4 \rightarrow \text{Me}_4\text{Si} + 4\text{C}_2\text{H}_6$	-265,5	-264,2 (G3)	-257,5 (G4)	-265,4 \pm 15,3

Tabla 8. Reacción isodésmica utilizada para comprobar la entalpía de formación de la especie neutra. a [126].

Para convertir este dato a 298,15 K ($\Delta_f H_{298K}^{\circ} = \Delta_f H_m^{\circ}$) se emplea la siguiente expresión:

$$\Delta_f H_{0K}^{\circ} = \Delta_f H_{298K}^{\circ} - [H_{298K}^{\circ} - H_{0K}^{\circ}](\text{molécula o ion}) + [H_{298K}^{\circ} - H_{0K}^{\circ}](\text{elementos}) \quad (59)$$

Donde $[H_{298K}^o - H_{0K}^o](molécula\ o\ ion)$ se obtiene a través de las frecuencias calculadas y $[H_{298K}^o - H_{0K}^o](elementos)$ a partir de los valores conocidos de los átomos en el estado estándar [127]. La entalpía de formación calculada de esta manera, es $\Delta_f H_m^o(g) = 593,7 \pm 1,6\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Para comprobar la calidad de este resultado se calculó computacionalmente el valor de la entalpía de formación a 298 K a nivel *ab-initio* G3 y G4, obteniendo 582,5 y 585,6 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivamente.

	$\Delta_f H_{0K}^o(g)$	$H_{298K}^o - H_{0K}^o$ ^a	$\Delta_f H_m^o(g)$	$\Delta_f H_m^o(g)$ (literatura)
Si(C ₂ H ₅) ₄	208,9 ± 15,3 ^b	39,76	-265,4 ± 15,3 ^c	-238 ± 19 kJ mol^{-1f}
Si(C ₂ H ₅) ₃ ⁺	633,6 ± 1,6 ^d	33,20	600,4 ± 1,6 ^d	
C ₂ H ₅ [·]	129,2 ± 2,1 ^b	12,88	118,8 ± 2,1 ^e	

Tabla 9. Resultados obtenidos y valores auxiliares empleados en el estudio de disociación de tetraetilsilano, clorotrietilsilano y diclorodietilsilano. a Basado en el cálculo de frecuencias vibracionales y constantes rotacionales mediante el funcional M05-2X/6-311+G(d,p). b Convertido a 0 desde el valor a 298,15 K. c [126]. d Nuestros resultados. e Tomado del NIST. f [128]

4.3 Química Analítica

Hasta ahora se han descrito en el presente capítulo los resultados relativos a aquellos trabajos pertenecientes a la energética molecular en fase gas. Si bien el grueso de la tesis implica el estudio de sistemas moleculares atendiendo a su energética, fruto de la colaboración con otros grupos de trabajo surgen trabajos con un perfil analítico.

4.3.1 Impacto de extractos de levaduras secas enriquecidas en glutatión sobre la estabilidad de terpenos durante el envejecimiento del vino

4.3.1.1 Introducción

Durante la maduración del vino, la oxidación de ciertos compuestos presentes en él puede suponer el cambio en algunas de sus propiedades organolépticas. La pérdida de aromas agradables se produce por el descenso de la concentración de moléculas tales como tioles, terpenos y ésteres [121, 122] y la acumulación de otros compuestos indeseables como sulfuro de hidrógeno y metil-mercaptanos[123].

Hoy en día la mayoría de los vinos llevan dióxido de azufre en su interior que sirve como antioxidante y como antimicrobiano. No obstante estudios recientes muestran que el consumo de sulfitos de manera prolongada en el tiempo puede provocar problemas de salud [124]. En un intento para solucionar este problema, actualmente varios grupos estudian diferentes estrategias para conseguir salvar esta dicotomía, preservar el estado de los vinos en su envejecimiento sin emplear sulfitos, como el γ -L-glutamyl-L-cisteinglicina o GSH. El grupo de la Dra. Pozo-Bayón del Instituto de Investigación de Ciencias de la Alimentación (CIAL) es un promotor de trabajos como el presente, en el que se emplean alternativas al GSH puro como antioxidante tales como los preparados de levadura seca enriquecidos en GSH (*GSH enriched inactive dry yeast*, g-IDY). El uso de estos preparados está ganando interés dentro de la industria del vino por su mayor efectividad en la preservación de aroma y color durante el envejecimiento del vino.

Considerando este creciente interés y la carencia de publicaciones al respecto, el objetivo del trabajo desarrollado por el grupo de la Dra. Pozo-Bayón, en el que nuestra colaboración se centró en la identificación de metabolitos mediante FT-ICR-MS, ha sido evaluar el efecto de los g-IDY sobre algunos compuestos típicos aromatizantes del vino: linalool, α -terpineol, β -citronelol y nerol mediante el uso de modelos que simulan el vino en presencia de condiciones oxidantes aceleradas. También se evaluaron otros potenciales antioxidantes como otro g-IDY cuya función es de nutriente durante la fermentación y GSH comercial.

4.3.1.2 Discusión y resultados

Se emplearon un total de cuatro modelos de vino en este estudio: un control sin GSH o derivados, g-IDY, n-IDY y con GSH comercial. A estos modelos se les añadió de manera individual cada uno de los terpenos. Todos ellos fueron sometidos a condiciones oxidantes aceleradas durante 3 semanas a 25 °C saturando el espacio de cabeza con oxígeno.

Para dilucidar las estructuras de las moléculas con potencial antioxidante presente en cada una de las fracciones, se emplearon las técnicas CE-MS y FT-ICR-MS, siendo esta última la empleada por nuestro grupo para el análisis metabolómico no dirigido.

Las muestras se sometieron a ultrafiltración para evitar la presencia de glicoproteínas con masa molecular mayor a 3 kDa de los preparados IDY que podrían interactuar con los volátiles, disminuyendo el potencial antioxidante del GSH sobre estos compuestos. Por otra parte, las muestras se prepararon aromatizándolas individualmente con cada compuesto para evitar posibles reacciones paralelas entre terpenos.

La exposición a condiciones oxidantes aceleradas arrojó dos resultados interesantes: i) todos los agentes antioxidantes empleados redujeron la oxidación de los terpenos según el porcentaje de reducción en las área de los picos cromatográficos debidos a estas sustancias a tiempo $t = 0$ y $t = 21$ días; ii) Aunque todos ellos funcionan como antioxidantes, los aromatizantes se oxidan en mayor medida en presencia de GSH que en presencia de los extractos secos de levadura. La conclusión inmediata que se extrae de este resultado es que existen otros componentes diferentes al GSH presentes en el extracto seco de levadura (fracción < 3 kDa), responsables de su potencial antioxidante, razón por la cual se decidió hacer una búsqueda de metabolitos sulfurados en cada muestra.

Análisis de compuestos sulfurados mediante CE-MS

Además de GSH, otros compuestos biológicos que contienen azufre muestran un claro carácter antioxidante [125]. Por ello se llevó a cabo este análisis dirigido, buscando compuestos que tuvieran en su fórmula al menos un átomo de azufre. La existencia de estos átomos en la molécula proporcionarían al espectro de masas un pico de 2 Da de diferencia sobre el pico molecular de al menos 4 % de intensidad. Tras la revisión de los resultados obtenidos para n-IDY y g-IDY, junto a los aminoácidos que contienen dos átomos de azufre, metionina y cisteína, se encontraron otros 14 compuestos con contenido en azufre en el g-IDY. Algunos de los identificados son intermediarios metabólicos de los procesos de fermentación y maduración del vino.

Análisis metabolómico no dirigido: FT-ICR-MS

Se eligió esta técnica por ser una de las más empleadas para investigar mezclas complejas de productos naturales debido a su gran poder de resolución y precisión en la masa [126].

Algunos de los compuestos identificados mediante esta técnica contenían azufre en su composición tales como *S*-glutathionil-L-cisteína, γ -glutamyl-cisteína y glutatión oxidado, los cuales fueron identificados también por CE-MS en g-IDY. Además el ión con m/z 556,1379 fue identificado como biotinil-5-AMP, un intermediario en la síntesis de biotina.

Un hallazgo interesante fue la detección en ambas muestras de algunos péptidos pequeños, concretamente tripéptidos. Dos de ellos fueron encontrados en ambos extractos e identificados como histidina/cisteína/ lisina y metionina/lisina/histidina. En la figura 38 se muestran sus estructuras así como sus m/z frente a las teóricas. Debido a la baja concentración de estos péptidos, no fue posible determinar su secuencia mediante fragmentación de los mismos.

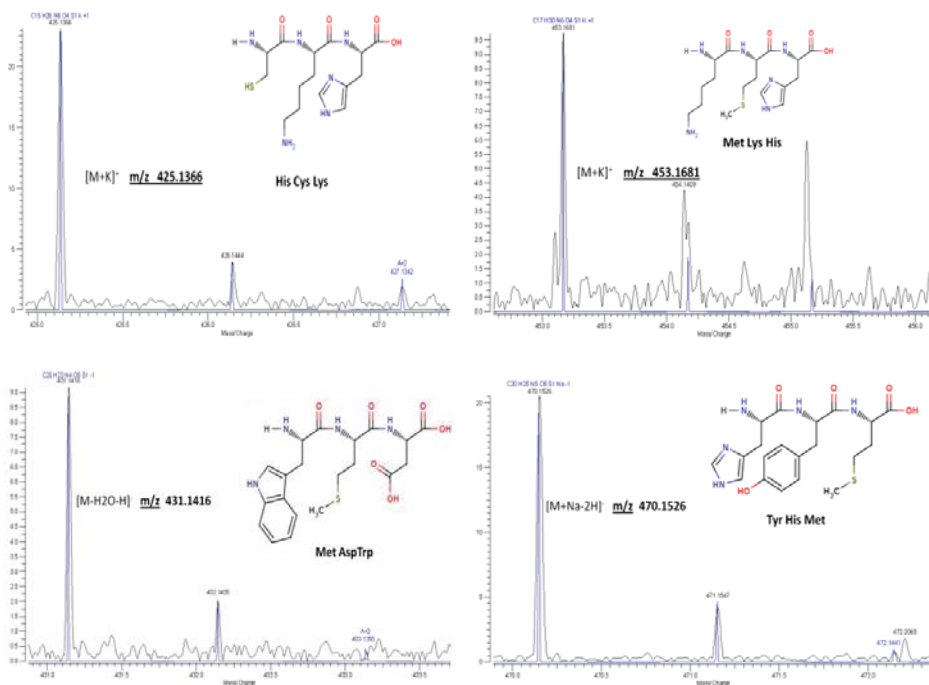


Figura 38. Estructuras químicas y ESI-FT-ICR-MS correspondientes a los péptidos identificados en los extractos < 3 kDa g-IDY y n-IDY.

4.3.1.3 Conclusiones

Se ha probado que el uso de preparados IDY (con o sin GSH) reduce la pérdida de ciertos terpenos durante el envejecimiento acelerado de vinos modelo. Se ha

mostrado también que los preparados g-IDY contienen, de hecho, GSH en su estado reducido, el cual puede contribuir a la preservación del aroma en estos vinos. Sin embargo se ha demostrado que la presencia de otros compuestos presentes y cuyo origen son las levaduras podrían actuar como cooperantes necesarios en la actividad antioxidante. Además, ambos extractos contienen pequeños péptidos con metionina, triptófano y tirosina, identificados mediante FT-ICR-MS, que parecen estar involucrados en las propiedades antioxidantes determinadas para ambos extractos.

A la vista de los presentes resultados y conclusiones se hacen necesarios futuros trabajos dirigidos a identificar inequívocamente la secuencia de estos compuestos. Indudablemente, esto será interesante para la industria del vino y biotecnología del mismo.

4.3.2 Descomposición térmica de almidón y celulosa en pan tostado y sistema modelo

4.3.2.1 Introducción

Muchos productos de la dieta que contienen polisacáridos, mayormente almidón y celulosa, son procesados mediante tratamiento térmico. Al igual que pasa con la formación de caramelo a partir de mono- y disacáridos, la estructura química de los carbohidratos se ve modificada drásticamente por el calentamiento. El presente trabajo, dirigido por el Dr. Nikolai Kuhnert de la Jacobs University de Bremen, Alemania, estudia la los productos de descomposición térmica de almidón y celulosa como modelos, y compara los resultados con los hallados en muestras de pan tostado.

Los carbohidratos, las biomoléculas más abundantes en la naturaleza, están presentes en todos los organismos vivos bien como monosacáridos o bien combinados como polisacáridos [127], jugando un papel importante como material estructural y reservorio de energía [128]. El almidón y la celulosa son los dos polisacáridos más comunes presentes en una dieta, siendo la fuente más importante de energía química en la comida así como el elemento energético por excelencia en la dieta de los humanos[129-131].

En el campo de la investigación de los carbohidratos, es bien conocida la conversión química de glucosa y sucrosa en caramelo y la reacción de Maillard [132] entre los sacáridos y aminoácidos a elevadas temperaturas, formando las llamadas melanoidinas. A pesar de los muchos avances, la composición química de melanoidinas y los mecanismos de formación de carbohidratos tratados térmicamente aún no se conocen por completo.

En los últimos tiempos la espectrometría de masas ha evolucionado y se ha establecido como técnica de referencia para superar estas limitaciones y proveer por primera vez de la información acerca de los compuestos que se forman en este proceso así como de los mecanismos que llevan hasta ellos. Para afrontar este reto se ha seguido una estrategia secuencial basada tanto en instrumentos de masas de última generación como en técnicas avanzadas de quimiometría. En primer lugar se adquirieron espectros de masas de alta resolución via FT-ICR-MS y se obtuvieron las fórmulas moleculares propuestas según su correspondiente m/z . Usando gráficas de van Krevelen y análisis de Kendrick se consiguieron patrones de comportamiento molecular con los que se establecieron modelos estructurales y mecanísticos. Con estos datos, se seleccionaron moléculas de los productos de reacción principales y se sometieron a tándem LC-MS.

La importancia que tiene la descomposición térmica de polisacáridos va más allá de la química de los alimentos, otras industrias[133], incluyendo la del papel, adhesivos, cosmética, bioplásticos y biofuelen emplean estos compuestos en sus procesos.

4.3.2.2 Discusión y resultados

ESI-FT-ICR-MS

Los espectros de FT-ICR fueron adquiridos tanto en modo negativo como en modo positivo para las muestras de almidón y celulosa. En el espectro en modo positivo predominan los picos sodiados. La tabla 10 ilustra la relación de m/z de los productos encontrados, su composición elemental, y el error medido para el almidón como sacárido representante en modo negativo. Un cuidadoso estudio de esta tabla nos muestra la presencia de oligómeros de glucosa, en concreto tetrámeros, pentámeros y hexámeros a m/z 665, 827 y 989 respectivamente. Sin embargo, son los oligómeros

deshidratados los que dominan el espectro con m/z de 647, 809, 971, 1133 y 1295. La presencia de estas estructuras deshidratadas demuestran la pérdida consecutiva de hasta 8 moléculas de agua. Curiosamente, la descomposición térmica del almidón y la glucosa llevan a estructuras oligoméricas de glucosa, donde nunca hay menos de cuatro unidades monoméricas.

Pico	Designación	Fórmula mol.	m/z [M-H] Experimental	m/z [M-H] Teórico	Error relativo [ppm]
1	(Glu) ₄ - H ₂ O	C ₂₄ H ₄₀ O ₂₀	323.0998 ^b	323.0984	0.9
2	(Glu) ₆ - H ₂ O	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	485.1518 ^b	485.1512	6.3
3	(Glu) ₃	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	503.1597 ^a	503.1618	4.1
4	(Glu) ₄ - 3×H ₂ O	C ₂₄ H ₃₆ O ₁₈	611.1835 ^a	611.1829	1.0
5	(Glu) ₄ - 2×H ₂ O	C ₂₄ H ₃₈ O ₁₉	629.1967	629.1935	0.5
6	(Glu) ₄ - H ₂ O	C ₂₄ H ₄₀ O ₂₀	647.2036 ^a	647.2040	0.6
7	(Glu) ₅ - 2×H ₂ O	C ₃₀ H ₄₈ O ₂₄	791.2491	791.2463	0.4
8	(Glu) ₅ - H ₂ O	C ₃₀ H ₅₀ O ₂₅	809.2557	809.2568	8.6
9	(Glu) ₅	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	827.2638 ^a	827.2674	4.3
10	(Glu) ₆ - 2×H ₂ O	C ₃₆ H ₅₈ O ₂₉	953.3027 ^a	953.2991	3.8
11	(Glu) ₆ - H ₂ O	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	971.3097	971.3097	5.6
12	(Glu) ₆	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁	989.3198 ^a	989.3202	0.5
13	(Glu) ₇ - H ₂ O	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	1133.3631	1133.3631	0.1
14	(Glu) ₈ - H ₂ O	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀	1295.4191	1295.4196	0.2

Tabla 10. Datos de alta resolución (ESI-FT-ICR-MS) de almidón calentado y sus iones principales [M-H]⁺.

Los espectros de masas de almidón y celulosa son bastante similares, salvo por una sutil diferencia: el ion con m/z 683.18224, que corresponde a la fórmula C₃₀H₃₆O₁₈ en modo negativo, se encuentra únicamente para el almidón, mientras que el ion con m/z 941.29871 (C₃₅H₅₈O₂₉) se encuentra sólo en la celulosa. Estos dos iones pueden ser empleados como marcadores analíticos que indiquen la presencia de almidón o celulosa tratados térmicamente.

Interpretación de los resultados mediante quimiometría

Para visualizar los datos complejos que resultan del FT-ICR, se emplearon gráficas de van Krevelen y Kendrick. Así pues, ha sido en este trabajo en el que se aplican estos métodos para carbohidratos calentados por primera vez. Una reacción química general como una oxidación, reducción o deshidratación supone un cambio en el ratio O/H y O/C, de manera que ciertos tipos de compuestos pueden ser situados dentro del

conjunto en función de su localización dentro del gráfico. Por ejemplo, los carbohidratos, tienen ratios típicos $O/H \sim 2$ y $O/C \sim 1$ [134]. La gráfica de van Krevelen para el almidón y la celulosa se muestra en la figura 39. En general, el perfil de todos los gráficos es similar: existe una tendencia predominante correspondiente a un proceso de deshidratación (grupos I y II). El grupo de puntos enumerado como III con un déficit importante de oxígeno entre las moléculas, debido probablemente a la formación desproporcionada de productos de reacción redox. El último grupo, el IV, manifiesta una deficiencia de átomos de H que indica presumiblemente la presencia de estructuras heterocíclicas condensadas. Solamente un pequeño grupo de puntos aparece más allá de 1 en O/C y de 2 en O/H, lo que indica que la reducción en vez de la oxidación de estos compuestos es una ruta preferente y la deshidratación en lugar de la hidratación durante el proceso de calentamiento.

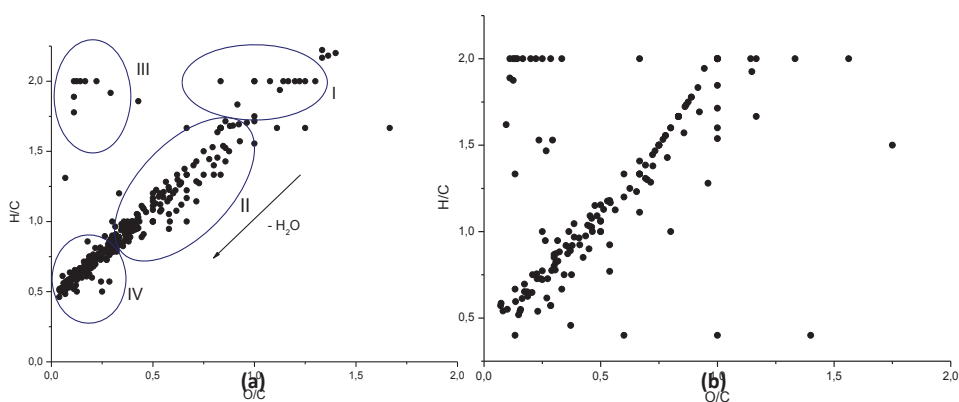


Figura 39. Diagramas bidimensionales de van Krevelen mostrando el ratio O/C frente a H/C de (a) almidón y (b) celulosa in modo negativo para un rango de m/z entre 50 y 1200.

La segunda técnica aplicada al estudio de la composición de los carbohidratos es la gráfica de Kendrick, la cual nos permite identificar series homólogas de compuestos que difieren en un incremento de masa predefinido[135]. El gráfico de Kendrick se construye representando los valores de defecto de masa de Kendrick (del inglés KMD) frente a la masa nominal de Kendrick. La masa de Kendrick resulta de multiplicar la masa IUPAC del compuesto por 0.999413399, factor resultante de $18/18.010565$ para una molécula de agua. La masa nominal de Kendrick (NMK) se define como la masa de Kendrick redondeada al entero más cercano y la KMD como la diferencia entre la masa exacta de Kendrick y la NMK.

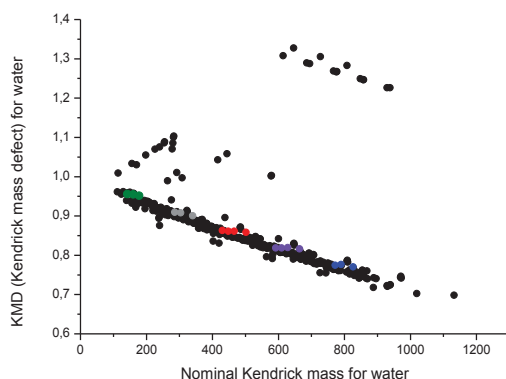


Figura 40. Mapa de Kendrick bidimensional para un incremento de masa de una molécula de agua de almidón en modo negativo.

Si los compuestos pertenecen a la misma serie, tendrán un mismo defecto de masa y aparecerán como una línea horizontal en el mapa de Kendrick. La gráfica de Kendrick fue construida para un incremento de una molécula de agua para el almidón como se muestra en la figura 40. Los gráficos para todas las muestras muestran la presencia de series homologas de compuestos cuyo incremento es una molécula de agua, indicando la presencia de oligómeros con hasta cinco glucosas monoméricas en el caso de la glucosa, y seis para el resto, mostrando pérdidas consecutivas de hasta ocho aguas.

El resto del proceso se centró en la caracterización de los compuestos predominantes en la descomposición térmica de los carbohidratos estudiados.

El comportamiento predominante en la secuencia de fragmentación para oligómeros de glucosa calentada implica la ruptura de enlaces glucosídicos por el extremo no reductor de la molécula. Sin embargo, la fragmentación de los oligómeros resultantes del calentamiento de almidón y celulosa son consistentes con la pérdida de agua encontrada en los productos del proceso.

Caracterización de los productos deshidratados

Las muestras calentadas dejaron como uno de las principales familias de compuestos productos deshidratados según las técnicas de van Krevelen y Kendrick. En el caso de la glucosa, estos picos fueron: m/z 323.1, 485.1, 647.2 y 809.2 con un

monómero deshidratado de glucosa a 161.1 de m/z. En el caso de almidón y celulosa calentados los picos fueron: m/z 647.2, 809.2, 971.3, 1133.4 y 1295.4.

Para comparar la estructura y el comportamiento frente a la fragmentación de estos compuestos, se llevaron a cabo experimentos empleando un láser de IR (IRMPD) como técnica de fragmentación sobre el ion m/z 647, tetrámero de glucosa con una fórmula molecular de $C_{24}H_{40}O_{20}$ para ambos polímeros.

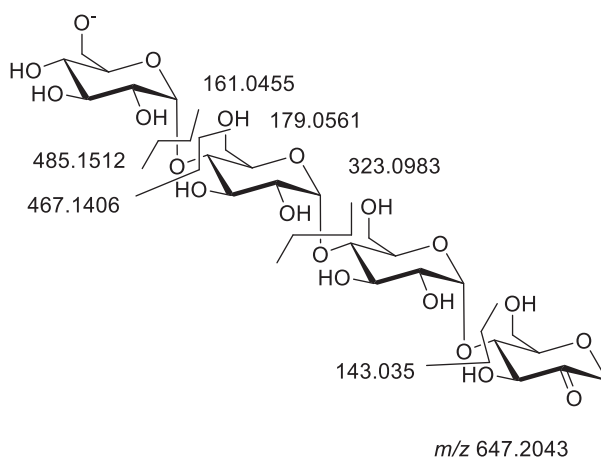


Figura 41. Patrón de fragmentación encontrado experimentalmente mediante FT-ICR-IRMPD para un tetrámero de glucosa.

La fragmentación del mismo oligómero procedente de ambos polisacáridos da un resultado similar, con algunas diferencias: en el almidón aparece el pico a m/z 467.14058, el cual corresponde al trímero deshidratado con fórmula $C_{18}H_{28}O_{14}$ y los iones con m/z 383.11701 ($C_{14}H_{24}O_{12}$) y 221.06659 ($C_8H_{13}O_7$) ambos procedentes de rupturas transversales de los anillos. En el caso de la celulosa, los picos únicos encontrados fueron a m/z 394.76693 y 254.85563.

Análisis con MALDI-MS de las muestras tratadas térmicamente

Estos experimentos se llevaron a cabo con DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid) como matriz del MALDI. Además de los oligosacáridos observados vía ESI, con esta técnica se encontraron oligosacáridos con mayor masa molecular, de hasta 11 miembros en el caso de la glucosa y 12 en el caso del almidón y la celulosa. En modo positivo, estos picos aparecen en su estado sodiado, muy común en los espectros de MALDI. Los picos encontrados para almidón y celulosa, con m/z 347, 509, 671, 833, 995, 1157, 1319,

1481, 1643, 1805 y 1967 corresponden a los aductos sodiados con hasta 12 moléculas de glucosa en su estructura. La observación de iones con mayor ratio m/z indica la utilidad del MALDI para cubrir una zona más extensa en el análisis de carbohidratos[136].

Los datos tomados con MALDI-MS corroboran los procesos de polimerización de glucosa, la despolimerización de los polisacáridos y la formación de derivados deshidratados en estos.

Análisis de los polisacáridos resultantes de la degradación térmica del pan

El pan horneado es uno de los alimentos procesados más antiguos de la humanidad. Aunque se han encontrado pruebas del consumo de trigo ya en el año 9000 a.C. al sudeste de la actual Turquía, no es hasta el año 3000 a.C. cuando se encuentra una escena en la tumba del faraón Ramsés III que muestra a su panadero haciendo pan y pasteles.

El análisis de la parte tostada del pan mostró un espectro demasiado complejo en ESI, no así mediante MALDI, donde el espectro mostró señales correspondientes a los oligómeros de carbohidratos. Por una parte, se puede ver la presencia de aductos sodiados correspondientes a cadenas de hasta doce moléculas de glucosa y por otra una serie de aductos sodiados correspondientes a los compuestos deshidratados con, también, hasta doce unidades.

4.3.2.3 Conclusiones

Las muestras de almidón, glucosa y celulosa resultantes de las pruebas de degradación térmica se analizaron mediante FT-ICR-MS. A partir de los espectros obtenidos, se aplicaron pruebas quimiométricas para dilucidar, por una parte la distribución de componentes en los productos de degradación y, por otra, para comprender las estructuras de tales productos mayoritarios y los mecanismos de reacción que llevaron a ellas. En el caso de la glucosa, cabe destacar la polimerización de la misma, mientras que en los polisacáridos se observa justamente el efecto contrario, una destrucción de las macromoléculas para dar oligómeros de entre 4 y 12 elementos. Por otra parte cabe destacar la deshidratación que sufren las cadenas de

glucosa en todas las muestras, pudiendo llegar a perder hasta 8 moléculas de agua. Ambas características no sólo se dan en los modelos de laboratorio, sino también en las muestras reales de pan procesado.

4.4 Resolución de isómeros

4.4.1 Introducción

LC-MS es una de las técnicas más empleadas a la hora de estudiar muestras complejas de origen vegetal [137-139]. En numerosas ocasiones, mientras se trabaja con estas muestras con técnicas como LC-MS, aparecen picos en el cromatograma con diferentes tiempos de retención pertenecientes a las mismas relaciones de m/z . Cuando estas especies alcanzan el espectrómetro de masas y son sometidos a fragmentación, dan un patrón similar en aquellos casos en los que se traten de isómeros estructurales. Para distinguir entre dos o más estructuras de este tipo, se suele emplear el tiempo de retención de los patrones puros como parámetro de trabajo. Si se dispone de una base de datos para contrastar el espectro de la muestra, la identificación de la especie en cuestión se suele hacer cotejando el tiempo de retención, la relación m/z del ion principal y los fragmentos obtenidos.

Sin embargo, esta estrategia supone trabajar siempre bajo unas condiciones experimentales muy estrictas, ya que si cambiáramos la columna, el disolvente, las condiciones de flujo o cualquier otra cosa, el tiempo de retención variaría lo suficiente como para no encontrar una identificación fiable.

Los equipos de espectrometría de masas se suelen emplear con fines puramente analíticos en la mayoría de los laboratorios. No obstante, como se ha descrito al comienzo de este capítulo, también son equipos muy útiles para investigar sistemas moleculares en fase gas desde un punto de vista energético o estructural (apartados 4.1 y 4.2). Este trabajo pretende dar una enfoque completamente diferente a la identificación de isómeros estructurales. Se pretende desarrollar un método cuyos resultados en la identificación no dependan de las condiciones experimentales anteriormente descritas, sino únicamente de las propiedades intrínsecas de la molécula.

Resolución de Energías mediante MS

“Energy Resolved Mass Spectrometry” (ERMS) es una técnica que consiste en fragmentar cada molécula a diferentes energías de colisión, llegando hasta la desaparición del precursor [140, 141]. Esta técnica aporta información relativa a la energía de activación de los analitos fragmentados bajo las condiciones de CID. Según el trabajo de Daikoku y colaboradores [142], si uno encuentra factores característicos de un cierto isómero, esta información puede ser empleada para dilucidar un isómero desconocido.

Los datos derivados de aquí se llevan a una gráfica donde se representa la intensidad relativa de cada compuesto durante la fragmentación frente a la energía de colisión. El resultado es una gráfica sigmoïdal (figura 42) donde los parámetros de cada curva son proporcionales a la energía del enlace roto, y por tanto a la estereoquímica del mismo.

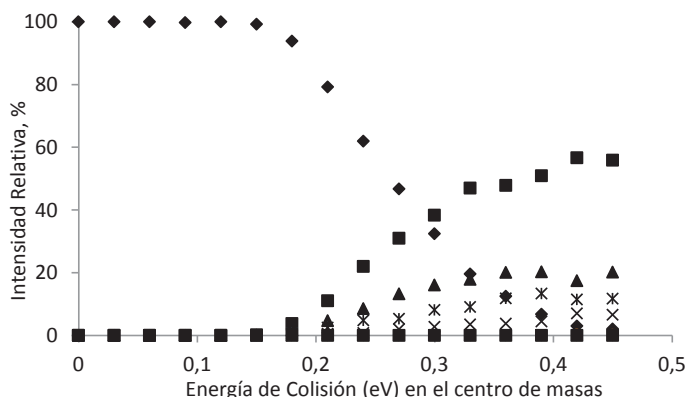


Figura 42. Gráfica tipo de un experimento ERMS. La curva de decaimiento corresponde a la desaparición del precursor y las demás a la formación de los diferentes fragmentos.

En resumen, se trata de un calibrado energético empleado para la dilucidación de isómeros estructurales basado únicamente en las propiedades del isómero en cuestión. Con esta metodología da igual si algún parámetro instrumental varía en el futuro, ya que la identificación del isómero es independiente de los mismos.

Este trabajo aporta como novedad la posibilidad de identificar isómeros estructurales independientemente de cuales sean las condiciones experimentales, sin embargo, el método se podría perfeccionar eliminando de la ecuación los patrones para el calibrado energético, que en numerosas ocasiones no están disponibles

comercialmente o son extremadamente costosos. En su lugar se planteó la posibilidad de elaborar las curvas de calibrado mediante cálculos computacionales, solventando el anterior problema. No obstante, esta es una labor que aún está pendiente.

Ácidos Clorogénicos

Los ácidos clorogénicos o *Chlorogenic acids (CGA)* son una familia de ésteres formados entre ácidos *trans*-cinámicos y (-)-ácido quínico. Estos compuestos son exclusivamente de origen vegetal y son polifenoles antioxidantes presentes en muchas plantas, como el té, el café y numerosas plantas medicinales[143]. Su importancia es enorme en la química de los antioxidantes[144] o como inhibidores de mutágenos cancerígenos[145] entre otros. A la hora de analizar una planta es muy común encontrar presencia de alguno de estos compuestos. En la figura 43 están representadas las moléculas sobre las que se ha usado la técnica ERMS.

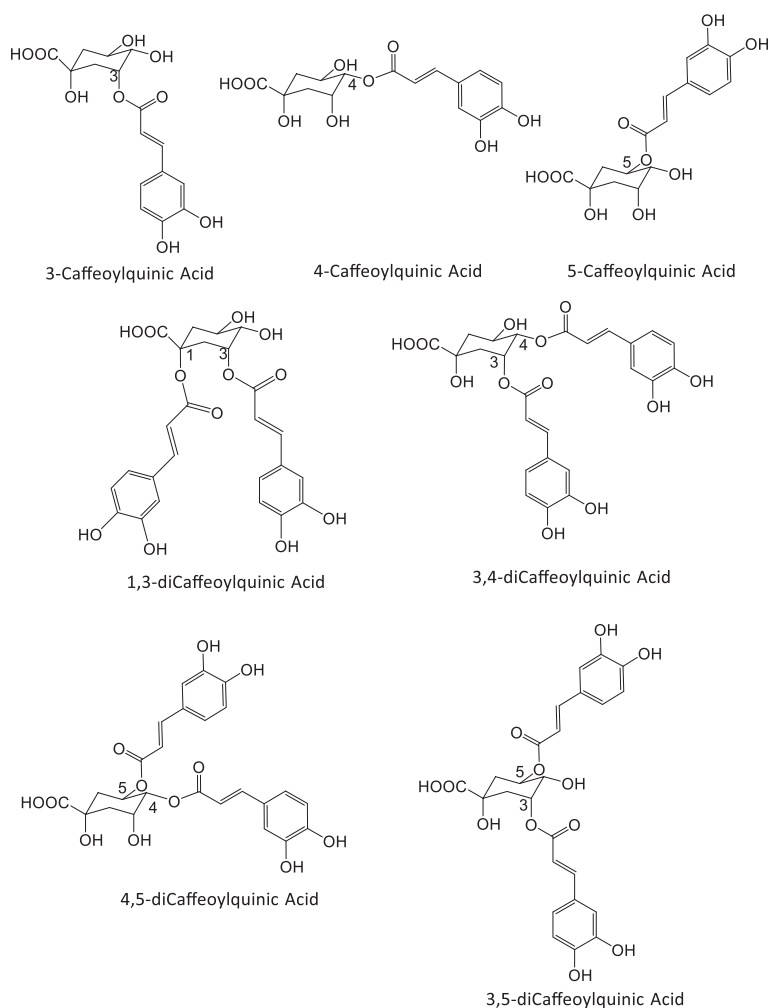


Figura 43. Estructura la de las moléculas bajo estudio en este trabajo.

4.4.2 Metodología experimental

El presente trabajo fue llevado a cabo por el doctorando en los laboratorios del Profesor Nikolai Kuhner de la Jacobs University de Bremen, Alemania.

Los compuestos empleados para este estudio como patrón fueron comprados a Phytolab y usados sin purificación adicional. Los experimentos fueron llevados a cabo en un trampa iónica cuadrupolar (QIT) con un electrospray (ESI) como fuente de ionización (Bruker Daltonics HCT Ultra, Bremen, Alemania) operando en full scan. Las muestras, disueltas en metanol, fueron inyectadas por infusión directa a 120 $\mu\text{L/h}$. El gas de colisión fue helio con una presión media de 4×10^{-6} mbar. Los parámetros se

configuraron como sigue: la presión del gas de nebulización se situó a 10 psi, el gas de secado a 5 L/min y 250 °C, fragmentación inteligente off, rango del espectro 50-750 m/z, estabilidad del compuesto 300 %, ICC 70.000 con una acumulación de 200 ms y un cutoff del 27 %.

En estos experimentos la resolución de la energía de colisión se situó en 0.03 V, comenzando en cero y acabando a un potencial suficiente para reducir el precursor por debajo del 0.5 %. Se acumularon cinco ciclos para asegurar una reducción en el error asociado.

Para la adquisición de los espectros los iones fueron aislados con una ventana de 4 unidades de m/z y sometidos a colisión mediante CID, teniendo en cuenta todos los picos isotópicos con intensidad mayor al 1 %. Para obtener las gráficas ERMS, se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$I_i^{rel} = \frac{I_i^{abs}}{I_i^{abs} + \sum_{i=1}^n I_p^{abs}} \quad (60)$$

$$I_i^p = \frac{I_i^{abs}}{I_i^{abs} + I_p^{abs}} \quad (61)$$

La ecuación 60 define la intensidad relativa de cada fragmento y del precursor sobre la suma total de intensidades. Esto hace referencia al peso específico de la intensidad de cada componente en relación a la total. La ecuación 61 se establece para comparar la evolución de los mismos productos (misma m/z) procedentes de diferentes precursores. Es, en otras palabras una forma de normalizar las curvas de formación de los mismos productos. Los datos experimentales derivados de estas curvas son ajustados a una curva sigmoide de Boltzmann siguiendo las ecuaciones siguientes:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\left[\frac{(x-x_0)}{dx}\right]}} + A_2 \quad (62)$$

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\left[\frac{-(x-x_0)}{dx}\right]}} + A_2 \quad (63)$$

Donde A_1 es el valor mínimo, A_2 la máxima respuesta, x_0 es el valor de x (energía de colisión) a media altura de la máxima respuesta y dx es el valor de la pendiente para x_0 . OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA USA) se empleó para hacer el ajuste teórico y estadístico de los datos. Aunque las curvas ERMS obtenidas son útiles para diferenciar especies a primera vista y seguir su evolución, no es práctico para emplearlas como método de calibrado. Con el fin de simplificar esto, se representa un segundo set de gráficas basado en el trabajo de O. Kanie et al.[146], donde se representa la intensidad del fragmento frente a la intensidad de su precursor, resultando rectas con su correspondiente ecuación.

4.4.3 Discusión y resultados

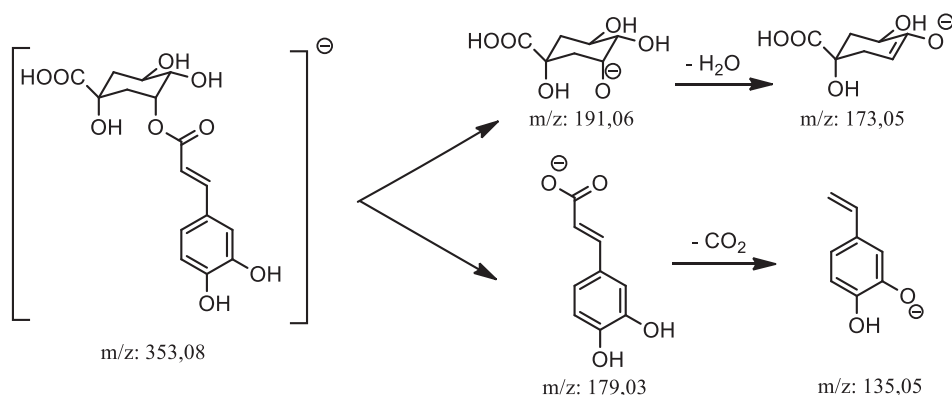
La correcta caracterización de una molécula es un asunto de vital importancia dentro de la química analítica. Sin embargo, a menudo aparecen problemas como la carencia de patrones comerciales o el cambio en algunas condiciones que hacen que la identificación y caracterización no sean posibles. El trabajo realizado con los CGAs pretende resolver, al menos, uno de los dos problemas asociados a su caracterización al depender esta únicamente de la molécula y no de su entorno.

Bajo estas circunstancias, las siguientes moléculas fueron sometidas a fragmentación total para estudiar su estabilidad frente a CID y extraer los datos necesarios para el calibrado energético: 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 1,3-diCQA, 3,4-diCQA, 4,5-diCQA y 3,5-diCQA. Todas ellas tienen en común una molécula de ácido quínico como núcleo, y unidos a este uno o dos radicales de ácido cafeico, difiriendo entre ellos en la posición del enlace.

Estudio y disociación de los mono-CQA's

El espectro de masas-masas de las moléculas estudiadas se conoce perfectamente, ya que el camino de fragmentación se ha estudiado anteriormente con detalle por numerosos grupos de investigación[147]. Sin embargo, no se ha llevado a cabo ningún estudio de su energética en fase gas. Se trata de moléculas con carácter ácido, y por tanto fácilmente desprotonables. El anión correspondiente se forma preferentemente en el grupo ácido del ácido quínico o en el hidroxilo en para del cafeico. En ambos casos su punto de fragmentación preferente ante la colisión es el éster formado por

ambos componentes principales, ácido quínico y ácido cafeico. De aquí se derivan los diferentes fragmentos que después se aprecian en el espectro. El esquema 8 muestra de forma resumida este camino de fragmentación con todos los productos formados.



Esquema 8. Productos derivados de la reacción de disociación unimolecular del 3-CQA bajo condiciones de CID.

La colisión rompe la molécula a ambos lados del éster, dando los fragmentos con m/z 191 y 179, los aniones del quínico y del cafeico respectivamente. A su vez, estos fragmentos pierden una molécula de agua y una molécula de dióxido de carbono respectivamente para dar los aniones con m/z 173 y 135. Así pues, existen hasta cinco posibilidades para calibrar un análisis ante estas moléculas atendiendo a su forma de romperse.

Dependiendo de la estereoquímica y de las posibles interacciones intramoleculares, el éster que se rompe tendrá una mayor o menor energía de enlace, estando su ruptura más o menos favorecida cinéticamente. Este fenómeno es el responsable de que las pendientes de las curvas de disociación sean diferentes para cada uno de los isómeros estructurales. La pendiente de cada curva está asociada con la cinética de la reacción[148]. Cuanto más pronunciada es esta pendiente, más rápido se rompen los enlaces, y más rápido desaparece el precursor. Esto nos da una idea de la estabilidad frente a la fragmentación con CID de cada uno de ellos.

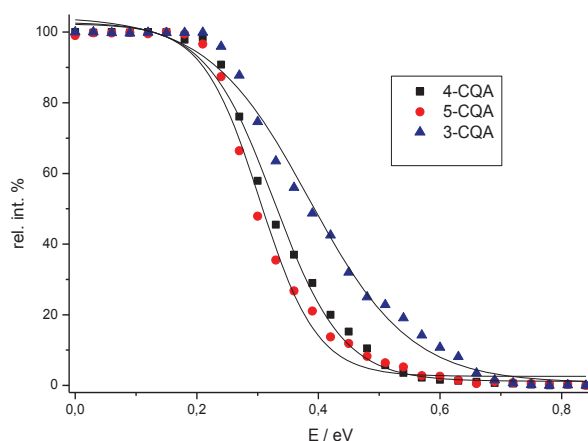


Figura 44. Curvas de disociación de los tres isómeros de ácido monocateoiloquinico. La energía está referida al centro de masas y la intensidad es la intensidad relativa sobre el total de fragmentos.

En la figura 44 se muestra una gráfica comparando las diferentes velocidades de desaparición de los isómeros con un solo cateico. Cabe destacar que para el isómero enlazado en la posición 3, su pendiente es claramente menor, considerándose más estable frente a la disociación. Si observamos la figura 45 vemos como es precisamente este isómero el que tiene una conformación diferente. Dentro de la configuración de silla del ácido quinico, la posición 3 es la única de los tres isómeros estudiados en posición axial. Esto, por un lado aporta cierta inestabilidad a la molécula por la formación de una interacción gauche con el hidroxilo de la posición 1. Sin embargo, es mayor la estabilidad que encuentra la molécula precisamente gracias a la interacción de este hidroxilo con el oxígeno del grupo ácido del cateico.

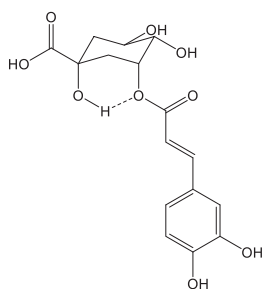


Figura 45. Isómero 3-CQA formando un enlace de hidrógeno intramolecular.

Esto promueve la formación de un ciclo de seis miembros por enlace de hidrógeno intramolecular (figura 45). Por esta razón, ante igualdad de condiciones en la colisión,

este isómero mantiene una estabilidad superior. Observando la gráfica se aprecia que el orden de estabildades frente a CID decrece con la posición de la unión: 3-CQA > 4-CQA > 5-CQA.

Esta gráfica, que compara las estabildades de todos los isómeros frente a CID, surge de los llamados "*break down diagrams*" de cada uno de ellos. En estos diagramas, se representa tanto la intensidad del precursor (decaimiento) como de los fragmentos que se van formando (crecimiento). A continuación se muestran los diagramas correspondientes a los tres isómeros estudiados (figura 46). Para simplificar la forma en que se utilizan estos datos de cara a un futuro experimento con muestras complejas, se decidió emplear el método de O. Kanie [146]: una segunda gráfica derivada de las primeras, únicamente para facilitar el objetivo de este método, donde se representan las intensidades relativas de cada uno de los fragmentos frente a la intensidad del precursor para cada energía dada. Esta representación nos devuelve una recta en cuya ecuación están embebidos los dos datos anteriores. Esta es la recta del calibrado energético definitivo. Ahora sólo necesitamos calcular las intensidades relativas de cada pico en la fragmentación de uno de estos compuestos procedentes de una muestra compleja real y aplicarlas sobre la recta de calibrado. Como se puede ver, de los fragmentos anteriormente descritos, no todos tienen la misma intensidad, ni absoluta, ni relativa. Analizando de un vistazo estas gráficas encontramos diferencias visuales significativas entre las intensidades relativas del pico con m/z 191 para los tres isómeros. Esta es la razón por la que se decidió tomarlo como pico calibrante.

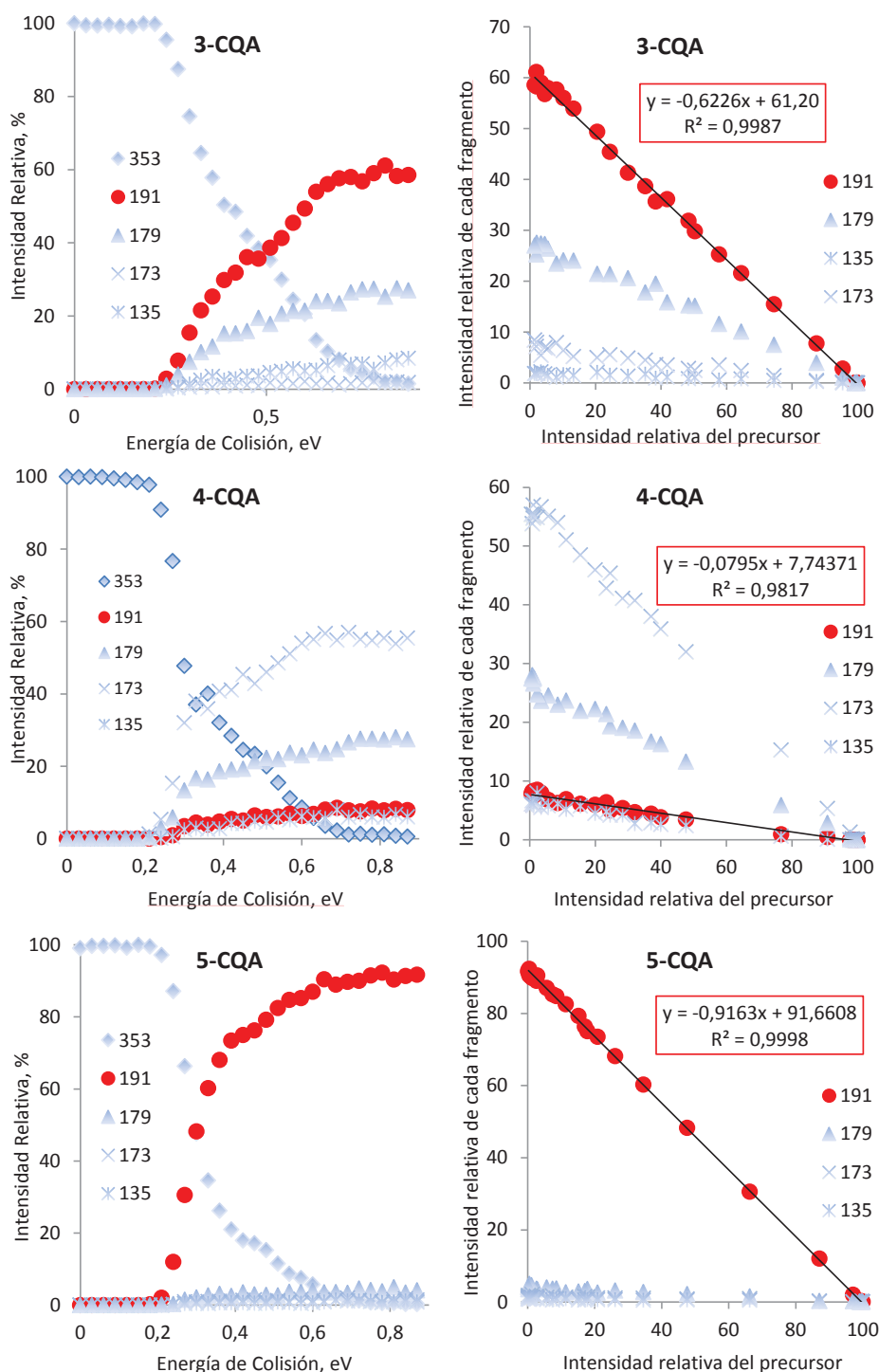


Figura 46. Diagramas de fragmentación y ajustes lineales derivados para los compuestos 3-CQA, 4-CQA y 5-CQA. Los datos correspondientes al ion con m/z 191 están resaltados en rojo.

Estudio y disociación de los di- CQA's

Las moléculas estudiadas en este apartado son un poco más complejas que las anteriores. En este caso hay dos ácidos cafeicos unidos al anillo de quínico (figura 44). Sin embargo, el patrón de fragmentación de este conjunto es muy similar a aquel encontrado para los *mono*-CQA, con una única diferencia cualitativa: en este caso se pierden secuencialmente los radicales cafeico. De esta manera, el primer ion que se forma es el 353, correspondiente al monocatefico.

Siguiendo la metodología anteriormente descrita, el primer paso fue determinar la estabilidad de los iones precursores frente a la colisión mediante CID. En este caso, las pendientes están más diferenciadas, devolviendo esta gráfica el siguiente orden de estabilidades (del más estable al menos): 3,4-diCQA, 1,3-diCQA, 4,5-diCQA y 3,5-diCQA.

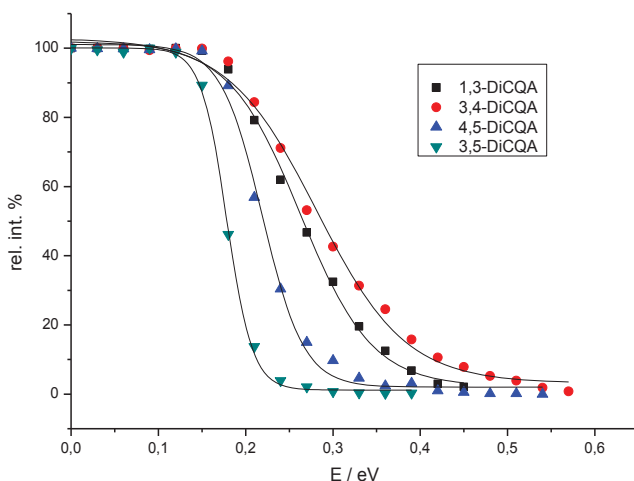


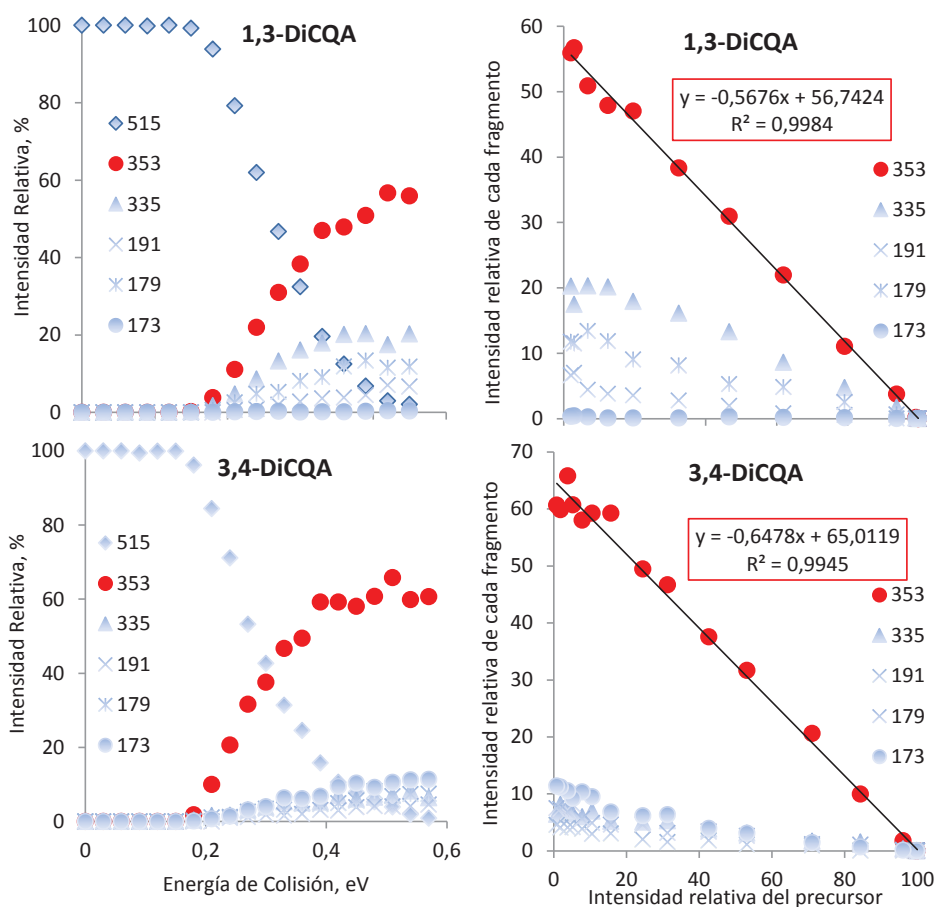
Figura 47. Gráfica con el decaimiento de los ácidos *di*-cateico. Se representa la intensidad relativa del precursor (m/z 515) frente a energía de colisión en el centro de masas en eV.

Al igual que ocurría en el set de muestras anteriores, en este caso existe también un ion cuya formación tiene una energía característica para cada isómero. El ion que se ha seleccionado para el calibrado energético de los CGAs con dos cateicos es el 353.

Conviene aclarar, que aunque para las moléculas estudiadas se han encontrado resultados suficientemente claros atendiendo solamente a uno de los iones principales, puede ocurrir que este comportamiento no se haga norma en otras

familias de isómeros. En aquellos casos que esto pudiera ocurrir, bastaría con buscar otros iones en la fragmentación utilizables como factores de calibración o incluso ir un paso más allá y trabajar con los iones derivados de una segunda fragmentación en un proceso de MS³.

Los resultados de la fragmentación de estos cuatro isómeros estructurales se muestran a continuación:



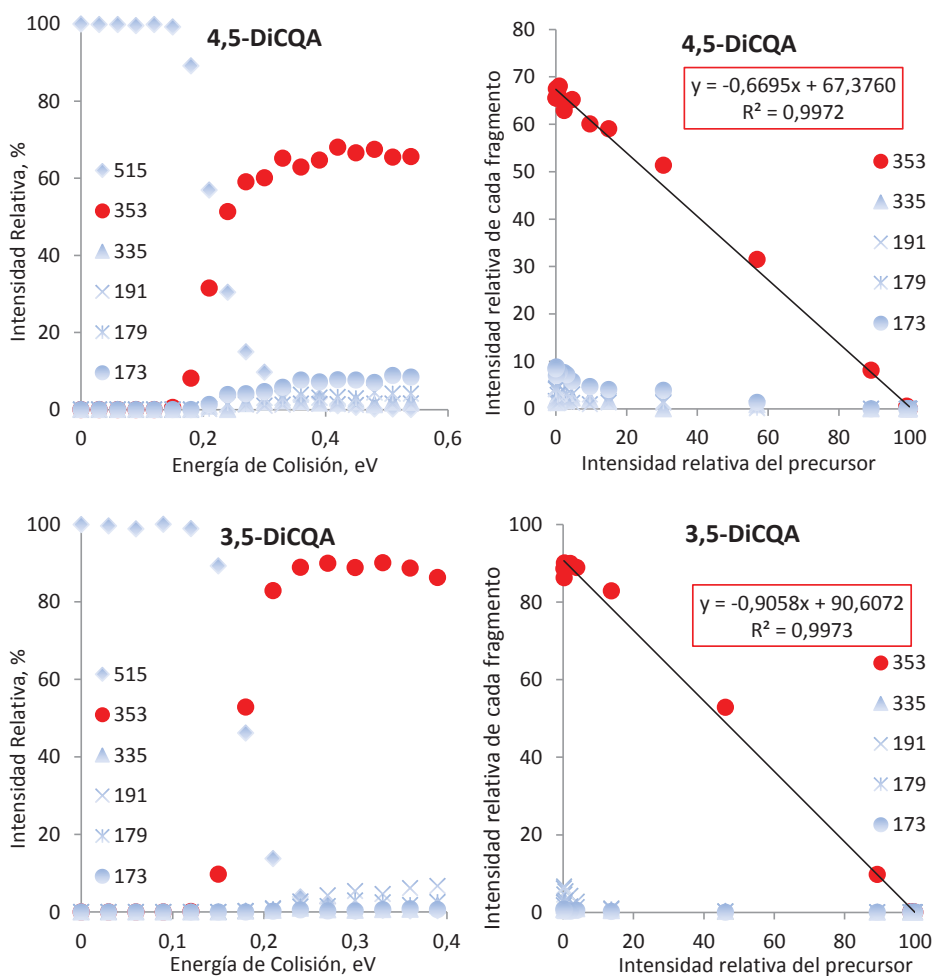


Figura 48. Diagramas de fragmentación y ajustes lineales derivados para los compuestos 3,4-diCQA, 1,3-diCQA, 4,5-diCQA y 3,5-diCQA. Los datos correspondientes al ion con m/z 353 están resaltados en rojo.

Una vez obtenidas las rectas de calibrado, sólo queda comprobar la validez de este método aplicándolo a un análisis de muestras reales. En tal caso, se tomará la intensidad relativa del precursor (variable independiente del calibrado) y se determinará el valor de la variable dependiente en la ecuación. Si el método es correcto, se adaptará mejor a la ecuación que corresponda al isómero en cuestión.

Análisis de Loniceraspp.

Lonicera (comúnmente conocida por MadreSelva) es un género de planta original del hemisferio norte que crece como arbusto. Se han catalogado 180 especies, de las cuales más de 100 se encuentran en China, India, Europa y Norte América. Algunas de estas especies tienen propiedades medicinales conocidas desde hace siglos en la medicina tradicional china. Por ejemplo, se emplean infusiones de *L. japonica* en el tratamiento de una amplia variedad de síntomas como fiebre debida a catarrros, fiebre epidémica o hemorragias por disentería[149-151]. En el caso de la especie *L. japonica*, se ha documentado su alto contenido en polifenoles, especialmente en sus flores[152, 153].

La dieta humana contiene un sinnúmero de componentes no nutritivos con propiedades benéficas para la salud. En este conjunto se engloban los polifenoles, entre cuyas propiedades cabe destacar su potencial antioxidante. Los beneficios sobre la salud de este tipo de compuestos se asocian a la prevención de procesos de cáncer, diabetes o enfermedades cardiovasculares[154]. Esta es la razón por la que estas moléculas resultan tan interesantes para la comunidad científica. Sin embargo, la identificación certera de ciertos compuestos con más de un isómero estructural y presentes en muestras vegetales de manera habitual es, aún, algo confusa por tener espectros de fragmentación iguales. Los grupos de los profesores Clifford y Kuhnert se han enfrentado a este problema con bastante éxito[147, 155, 156], sin embargo, ninguno de ellos lo ha hecho a través de un método sistemático que pueda aplicarse a cualquier familia de isómeros. Para comprobar que el método analítico desarrollado es útil, se llevó a cabo el análisis de las siguientes especies de *Lonicera* mediante HPLC-MSⁿ: *L. hildebrandiana*, *L. giraldii*, *L. purpusii*, *L. periclymenum*, *L. alpigena*, *L. pileata*, *L. xylosteum* and *L. japonica*.

Preparación y análisis de las muestras

Se pesaron 10 g. de hojas de cada una de las muestras y se lavaron con agua fría durante 2 minutos. Se depositaron en un mortero y se añadió nitrógeno líquido hasta el borde del vaso. Las muestras completamente solidificadas se trituraron con la maza y se trasvasaron a un vaso de precipitados, donde se añadieron 100 mL de MeOH al 70

% v/v. El metanol actúa como precipitante para las proteínas y péptidos de gran tamaño, eliminándolos de la disolución.

La suspensión se batió durante 10 minutos manteniendo el vaso en un baño de agua helada para evitar el sobrecalentamiento del vaso y la consecuente degradación térmica de las muestras. Para asegurar la completa ruptura de la pared celular, cada muestra se sonicó durante 1 h. Estas muestras se diluyeron 10 veces en el mismo disolvente y se filtraron empleando filtros de 0.45 µm de poro.

El análisis se realizó con un cromatógrafo líquido Agilent 1100 series (Bremen, Alemania), compuesto de una bomba binaria, un automuestreador con un bucle de 100 µL y un detector diodo array UV. El equipo de LC fue acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica con fuente de ionización ESI (Bruker Daltonics HCT Ultra, Bremen, Germany) programado con auto MSⁿ. La fragmentación fue realizada en modo “fragmentación inteligente” con un potencial máximo de 1 V. Las condiciones de ionización fueron optimizadas para el ácido 5-cafeoilquínico, con una temperatura de capilar de 365 °C, un flujo del gas de secado de 10 L/min y una presión del gas de nebulización de 50 psi.

La separación mediante HPLC fue llevada a cabo con una columna tipo difenilo de 150 x 3 mm y 5 µm de tamaño de poro y un guardacolumna de 4 x 3 mm del mismo material (Varian, Darmstadt, Alemania). El disolvente A fue agua/ácido fórmico (1000 + 0.05 v/v) y el disolvente B metanol. La fase móvil se bombeó a un flujo final de 0.5 mL/min. El gradiente se programó como sigue: 10 a 70 % de B linealmente en 60 min seguido por 10 minutos en isocrático y retorno al 10 % de B en el minuto 80, manteniéndolo así durante 10 minutos más para reequilibrar la columna.

Resultados

El análisis de las muestras bajo las condiciones arriba indicadas, devolvió una serie de cromatogramas bajo los cuales se encuentran multitud de especies. Sin embargo, dado que el método de calibrado ha sido desarrollado para los CQAs, será para este grupo para el que se describan los resultados y se discutan los mismos.

En las figuras 49 y 50 se muestran los *Extracted Ion Chromatogram (EIC)* para los iones con m/z 353 y 515, correspondientes a las once muestras estudiadas.

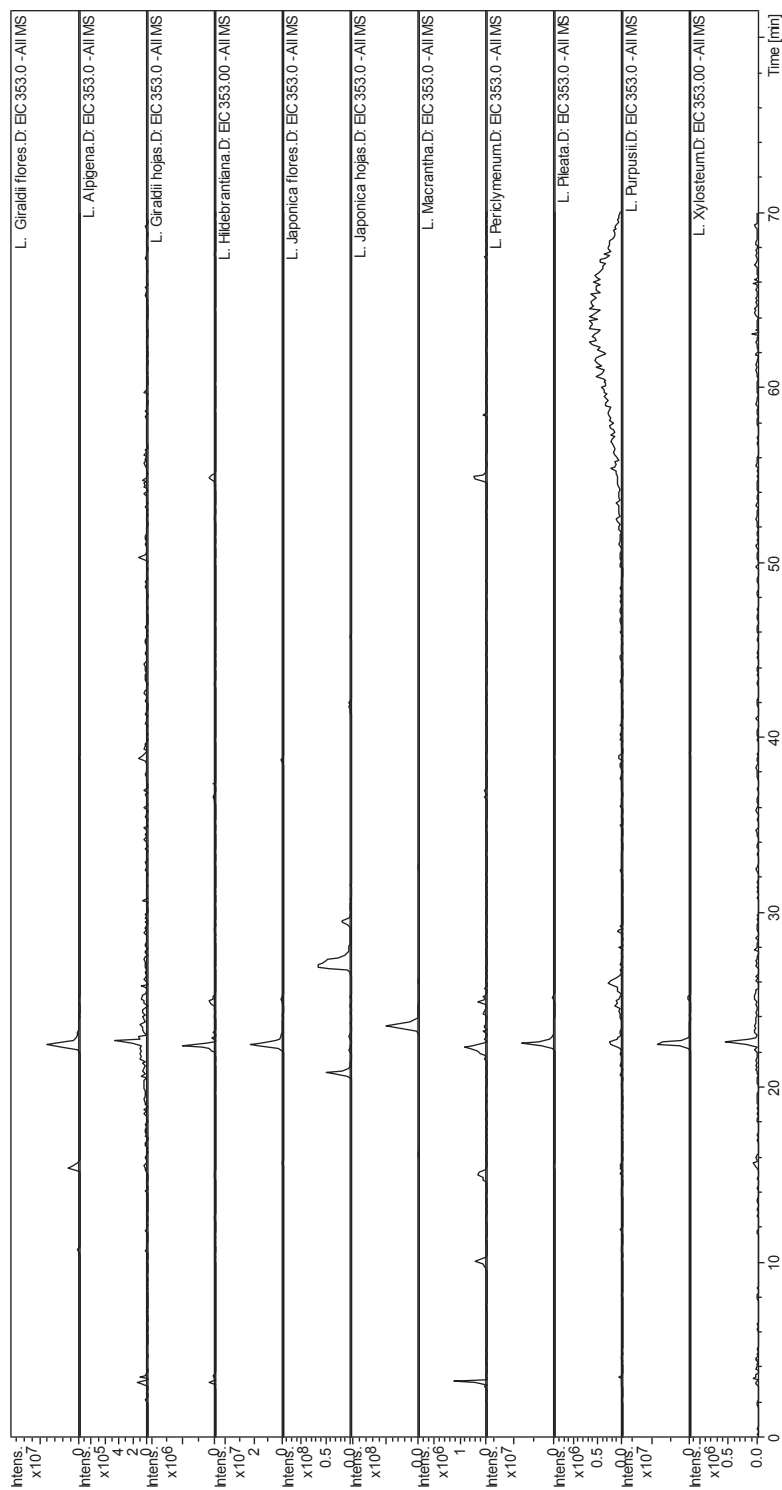


Figura 49. Comparación de los EIC para el ion con m/z 353 para cada especie. Se pueden apreciar las diferencias en el contenido de estos compuestos entre todas las muestras.

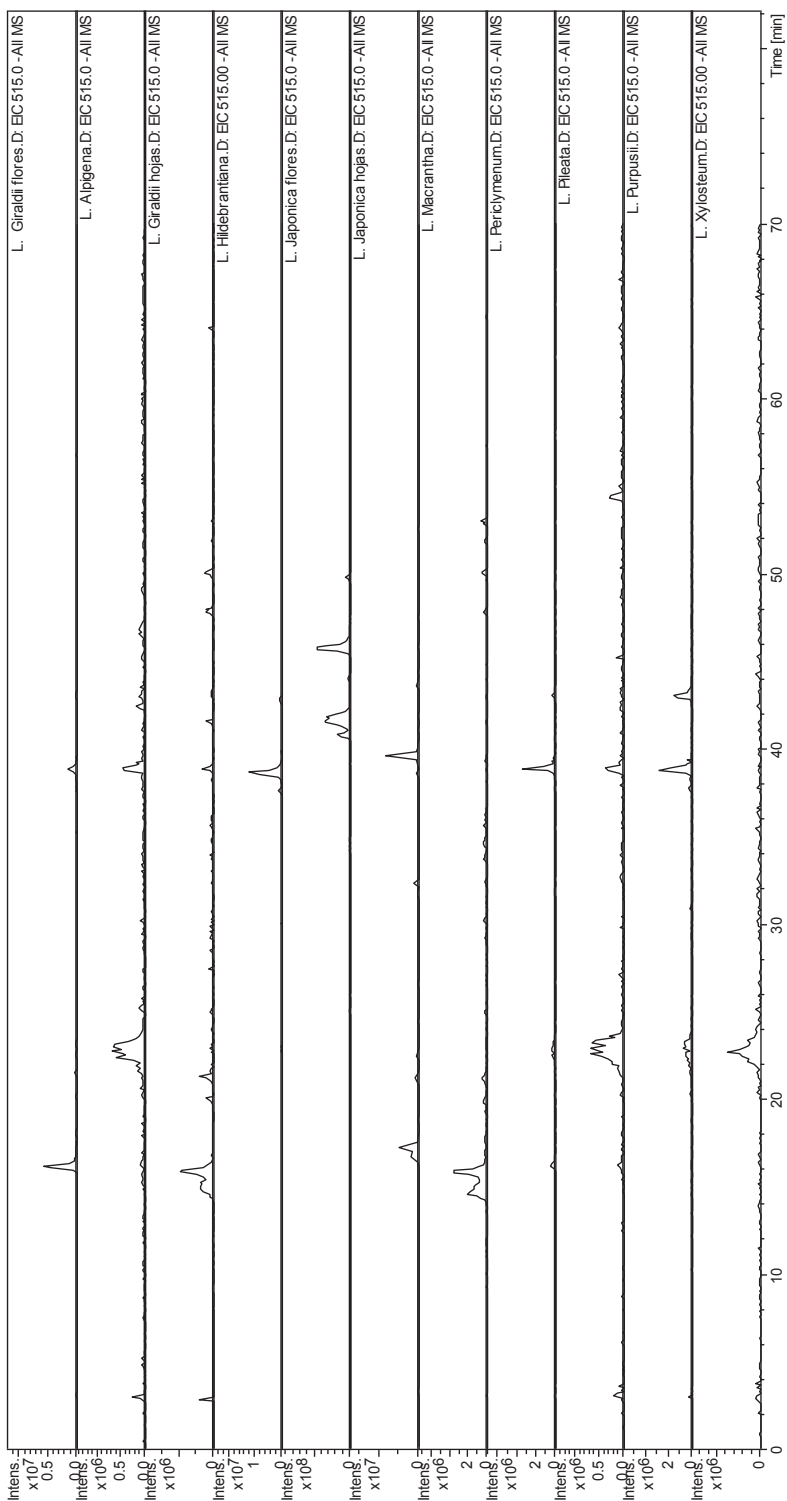


Figura 50. Comparación de los EIC para el ion con m/z 515 para cada especie. Se pueden apreciar las diferencias en el contenido de estos compuestos entre todas las muestras.

Como muestran los EIC, en la mayoría de las muestras se ha encontrado al menos un polifenol del conjunto de CQAs. Como se puede observar, la especie *L. Japonica*, ampliamente estudiada[152, 153], es la más rica. No obstante, y aunque las demás especies no tengan un contenido tan alto en polifenoles, no pierden interés de cara al trabajo aquí realizado, ya que todos los CQA para los que se ha desarrollado el método existen en el conjunto de las muestras. Conviene aclarar que en los EICs del ion m/z 515 aparecen picos cromatográficos tempranos a tiempos de retención en torno a los 15 y 22 minutos, sin embargo estos picos corresponden al compuesto formado por una molécula de ácido quínico, una de ácido cafeico y una hexosa. Los picos correspondientes a di-CQAs aparecen del minuto 35 en adelante. Como ejemplo del proceso de tratamiento de los datos, se ha seleccionado el EIC del ion m/z 515 de la muestra *L. Japonica* (flores) junto con los espectros de MS^n correspondientes a los picos principales (figura 51). Como se puede apreciar a simple vista, los fragmentos derivados de la ruptura del ion m/z 353 no tienen las mismas intensidades relativas entre sí, perteneciendo claramente a especies diferentes. La tabla 11 resume las intensidades en valor absoluto (unidades arbitrarias) de los todos fragmentos de los iones con m/z 515. Aplicando la ecuación 56 a estos datos se extrajo la intensidad relativa del ion con m/z 353, empleado en el calibrado de las especies con dos cafeicos. Dado que la energía de colisión fue de 1 V, la intensidad asociada al precursor fue cero. Con esta información se aplicó la ecuación de la recta de calibrado, donde $x = 0$ y por tanto $y = \%$ del ion m/z 353. Por comparación entre los valores derivados de los análisis de muestras reales y los calibrados con patrones, se pudo determinar con bastante precisión qué isómero era cada uno.

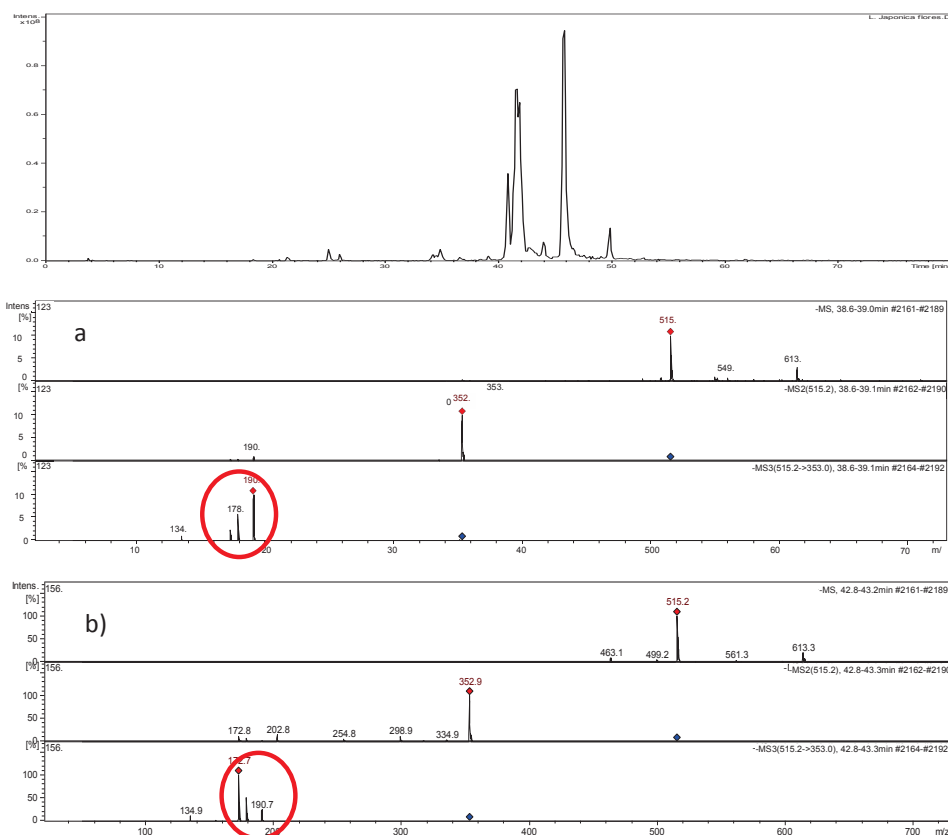


Figura 51. EIC del ion m/z 515 de *L. Japonica flores* y los espectros de MS^n correspondientes a los isómeros a) 3,5-diCQA y b) 3,4-diCQA.

Isómero a)		Isómero b)							
m/z	Int.	m/z	Int.	m/z	Int.	m/z	Int.	m/z	Int.
172.7	42.180	154.8	42.733	254.8	258.969	203.7	118.375	351.2	10.823
178.7	291.101	172.8	1.078.982	255.8	90.425	204.6	28.689	352.9	8.887.684
179.7	25.045	173.8	121.109	291.0	18.139	208.7	10.692	353.9	1.522.715
190.8	632.803	174.8	123.508	298.9	589.698	210.8	43.229	354.9	233.412
191.7	56.204	175.7	9.625	299.9	58.963	216.7	18.352	378.9	35.167
310.0	60.827	178.8	681.372	316.9	241.545	225.8	17.435	427.1	29.261
334.9	69.701	179.8	52.061	317.9	49.947	226.7	59.252	467.3	59.166
351.3	27.800	180.8	9.421	318.9	17.002	227.8	15.124	468.2	9.432
352.9	8.676.949	190.7	231.258	334.9	313.875	228.7	13.044	469.2	13.642
353.9	1.952.984	191.7	9.366	335.9	15.406	236.8	12.219	471.1	49.380
354.9	57.052	202.8	1.362.397	340.8	15.590	246.7	12.091	472.2	13.967

Tabla 11. En esta tabla se recogen las intensidades, en unidades arbitrarias, para cada uno de los iones detectados en los espectros de masas reflejados en la figura 52.

A continuación se recogen los datos correspondientes a las rectas de calibrado de los siete compuestos aquí estudiados, así como la proporción calculada del ion m/z

353 para los dos ejemplos anteriores y cotejada con la tabla de calibrado. El resultado, como se puede ver en la tabla 13, muestra la presencia de, al menos, los isómeros 3,5-*di*CQA (a) y 3,4-*di*CQA (b) en la especie *L. Japonica* (flores).

Isómero	Ordenada en el origen	Error	Pendiente	Error
3-CQA	61,2000	0,7263	-0,6226	0,0111
4-CQA	7,7437	0,1741	-0,0795	0,0030
5-CQA	91,6608	0,4422	-0,9163	0,0076
1,3- <i>di</i> CQA	56,7424	0,4375	-0,5676	0,0061
3,4- <i>di</i> CQA	65,0119	0,7502	-0,6478	0,0113
4,5- <i>di</i> CQA	67,3760	0,5307	-0,6695	0,0086
3,5- <i>di</i> CQA	90,6072	0,8970	-0,9058	0,0137

Tabla 12. Resumen de los datos correspondientes a las rectas de calibrado de los siete isómeros estructurales aquí estudiados.

Tiempo de retención	Intensidad total	Intensidad ion m/z 353	Intensidad precursor	Int. Relativa 353 (%)	Isómero
38,8	11.892.646	10.686.985	0	89,9	3,5- <i>di</i> CQA (a)
43,0	16.604.542	10.643.811	0	64,1	3,4- <i>di</i> CQA (b)

Tabla 13. Resumen de los datos de intensidad total, intensidad absoluta (en unidades arbitrarias) debida al ion con m/z 353, la intensidad relativa que este dato representa y los isómeros correspondientes según la tabla de calibrado.

Por último, se aplicó este método a todas las especies encontradas en los cromatogramas debidos a los iones con m/z 353 y 515 de todas las especies de *Lonicera* empleadas en el trabajo. Los resultados se pueden ver resumidos en la tabla siguiente. Como se puede apreciar, al menos en lo que a CQAs respecta, la especie *L. Japonica* es la que tiene una mayor abundancia (tabla 14).

Compuesto	Tiempo de retención	<i>L. Hildebrandtiana</i>	<i>L. Giralddii</i> (hojas)	<i>L. Giralddii</i> (flores)	<i>L. purpusii</i>	<i>L. Peridymenum</i>	<i>L. Alpigena</i>
Ácido 3-cafeoilquinico	15.6	-	-	62,9(15,3)	-	59,4 (15,4)	-
Ácido 4-cafeoilquinico	17.5	-	-	-	7,6 (17,3)	-	-
Ácido 5-cafeoilquinico	22.4	90,8 (22,4)	-	92,0 (22,3)	88,7 (22,3)	-	-
Ác. 1,3-dicafeoilquinico	37.5	58,1 (37,6)	-	-	56,2 (37,7)	-	-
Ác. 3,4-dicafeoilquinico	43.0	-	-	-	64,4 (43,0)	65,2 (43,0)	-
Ác. 3,5-dicafeoilquinico	40.7	-	-	-	-	-	-
Ác. 4,5-dicafeoilquinico	38.9	89,4 (38,8)	-	88,1 (38,8)	89,5 (38,7)	89,7 (38,8)	88,6 (38,9)
Compuesto	Tiempo de retención	<i>L. pileata</i>	<i>L. xylosteum</i>	<i>L. macrantha</i>	<i>L. Japonica</i> (hojas)	<i>L. Japonica</i> (flores)	
Ácido 3-cafeoilquinico	15.6	-	-	-	62,0 (15,4)	-	
Ácido 4-cafeoilquinico	17.5	-	-	-	-	-	
Ácido 5-cafeoilquinico	22.4	-	-	-	90,2 (22,4)	89,4 (22,3)	
Ác. 1,3-dicafeoilquinico	37.5	-	-	-	-	-	
Ác. 3,4-dicafeoilquinico	43.0	-	-	-	-	-	64,1 (43)
Ác. 3,5-dicafeoilquinico	40.7	-	-	-	-	-	67,7 (40,7)
Ác. 4,5-dicafeoilquinico	38.9	88,8 (38,8)	-	-	90,3 (39,6)	89,7 (38,8)	

Tabla 14. Tabla resumen donde se recogen los isómeros de CQAs identificados para las nueve especies de *Lonicera*, desglosando en hojas y flores las especies *L. Giralddii* y *L. Japonica*. Los números corresponden a la intensidad relativa del ion m/z 191 y 353 en *mono*-CQAs y *di*-CQAs respectivamente calculada según las ecuaciones de calibrado. En negrita se resalta el tiempo de retención descrito para este método cromatográfico en anteriores análisis, donde la identificación fue realizada siguiendo las claves de Clifford et al.[155]. Entre paréntesis el tiempo de retención encontrado con idénticas condiciones cromatográficas.

4.4.4 Conclusiones

El método aquí descrito se ha aplicado con buenos resultados a una serie de especies del género *Lonicera*. Se lograron identificar la totalidad de los isómeros estructurales de ácidos *mono* y *di* cafeoilquínico. El empleo de un método cromatográfico idéntico al empleado anteriormente en ese laboratorio, apoyó los resultados encontrados gracias a la comparación de tiempos de retención.

Clifford y Kuhnert desarrollaron un método hierático que establece las claves para la identificación de algunos CGAs [155]. Si bien este método es válido y ha sido ampliamente citado, el método aquí desarrollado pretende ir un paso más allá constituyendo un punto de partida para la sistematización en la elucidación de isómeros estructurales de cualquier familia. Este método, como se ha demostrado, es rápido y bastante preciso.

Esta metodología es lo suficientemente versátil como para permitir el uso de varios protocolos de trabajo. Es decir, en este ejemplo particular sólo ha sido necesario trabajar con las intensidades de uno de los fragmentos dado que las gráficas derivadas son lo suficientemente diferentes. Sin embargo, en caso de que no se hubieran encontrado diferencias significativas atendiendo a estos iones, se podría haber estudiado la relación en la formación de dos iones secuenciales (515->353->191) y haber aplicado MS³ por ejemplo.

De forma general, se puede afirmar que el presente método funciona porque cada isómero estructural, tiene un calor de formación (energías de enlace) y una dinámica de disociación específicos. En definitiva, las propiedades intrínsecas de una molécula suelen ser características y diferentes entre todas ellas.

5. Conclusiones

El presente trabajo recoge los resultados obtenidos a lo largo de los últimos cuatro años de investigación. En él aparecen múltiples estudios basados en la energética y la estructura de especies con intereses diversos.

El eje vertebrador de todo el trabajo es la espectrometría de masas, la cual no se reduce a una técnica puramente analítica, sino que es también una potente herramienta para estudiar las propiedades químico-físicas en fase gas. Bajo esta premisa, en el trabajo realizado se aprecia una evolución que va desde la determinación de parámetros termoquímicos como la acidez en fase gas hasta el desarrollo de novedosos métodos analíticos.

Este amplio abanico de trabajos ha sido posible sin duda a la variedad de equipos, muchos comerciales y otros no (PEPICO). No obstante, el entendimiento pleno de los procesos estudiados no podría haberse alcanzado sin la complementación de los resultados experimentales con los computacionales.

Así pues se han planteado y resuelto los siguientes temas de investigación:

1. GA en moléculas polifuncionales: ácidos hidroxicinámicos: este es uno de los primeros trabajos recogidos en la literatura donde se determinó la GA de moléculas polifuncionales.
2. GA en ácido barbitúrico y derivados: se midió la GA también en dos puntos. Los resultados concuerdan perfectamente con los calculados computacionalmente.
3. Caracterización termoquímica del paracetamol: se determinó la GA de esta molécula con interés farmacológico, encontrando una alta consistencia con los datos computacionales.
4. GA de complejos aminoboranos: se determinó la GA de una serie de complejos aminoboranos. Se midió y justificó computacionalmente el sorprendente incremento de acidez de grupos amino.
5. Estudio de closo-1-COOH-1,7-C₂B₁₀H₁₁ y derivados aminoácidos: se llevó a cabo el estudio de moléculas con posibles aplicaciones biológicas y tecnológicas. Se comparó sus GAs con las moléculas homólogos de carbono. Los cálculos

computacionales, una vez más, demostraron una buena concordancia con los resultados experimentales, confirmando estos últimos.

6. Estudio estructural del complejo cloroquina plata: se determinó la estructura del complejo formado por esta molécula con propiedades antimaláricas y un átomo de plata. Se observó y determinó la variedad de estructuras que puede formar tanto en sólido como en disolución.
7. Oligomerización aniónica de $\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$ y $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$: se estudiaron las múltiples estructuras en que se organizan estos compuestos en fase gas y se pudo determinar la sección eficaz del dímero de $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$ unido con un átomo de Li.
8. Propiedades estáticas y dinámicas del binol: se llevó a cabo una caracterización completa de las propiedades moleculares del binol, siendo la GA una de ellas.
9. Activación de enlaces $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$ intramoleculares en complejos de platino sulfonados: resultado de una intensa colaboración, se sintetizaron y caracterizaron una serie de complejos organometálicos de platino para los cuales se observó una activación de carbonos sp^3 mediante adición oxidativa. Se propuso una serie de mecanismos derivados de las fragmentaciones hechas mediante espectrometría de masas que se confirmaron mediante cálculos computacionales.
10. Dinámica de disociación y calor de formación de trietilsilano: se determinó la entalpía de formación a 0 K y a 298 K del tetraetilsilano mediante su disociación con iPEPICO.
11. Impacto de extractos de levaduras secas enriquecidas en glutatión sobre la estabilidad de terpenos durante el envejecimiento del vino: se probaron extractos de levadura en vinos sintéticos como antioxidantes naturales. Se confirmó el potencial antioxidante de estos extractos, siendo incluso mayor que el de la molécula GSH (glutatión reducido), molécula de referencia en estos trabajos. Para averiguar que otros compuestos sulfurados podían estar implicados en estos procesos oxidativos, se realizó un análisis metabólico no dirigido mediante CE-MS y FT-ICR-MS.
12. Descomposición térmica de almidón y celulosa en pan tostado y sistema modelo: se estudiaron los procesos de degradación de polímeros hidrocarbonados naturales (almidón y celulosa) por efecto del calor así como la caramelización de la

glucosa. Se establecieron modelos para estos procesos basados en los resultados derivados de la espectrometría de masas y técnicas de quimiometría.

13. Resolución de isómeros: usando los conceptos de los trabajos previos, se desarrolló un método para distinguir isómeros estructurales basado en su energética en fase gas. Este método, diseñado empleando ácidos clorogénicos como ejemplo, fue testado sobre muestras reales complejas extraídas de plantas de la familia Lonicera.

6. Bibliografía

1. Erba, E.B. and R. Zenobi, Mass spectrometric studies of dissociation constants of noncovalent complexes. Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry), 2011. 107(0): p. 199-228.
2. Topsom, R.D., *The Nature and Analysis of Substituent Electronic Effects, in Progress in Physical Organic Chemistry* 2007, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-20.
3. Addlagatta, A. and R. Reddi, Evidence for Functional Role of C-H...S Hydrogen Bond in Enzyme Catalysis and Substrate Specificity: Type 1 Methionine Aminopeptidase. Biophysical Journal. 106(2): p. 676a.
4. Astruc, D., The metathesis reactions: from a historical perspective to recent developments. New Journal of Chemistry, 2005. 29(1): p. 42-56.
5. Davalos, J.Z. and T. Baer, Thermochemistry and dissociative photoionization of $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, $\text{BrSi}(\text{CH}_3)_3$, $\text{ISi}(\text{CH}_3)_3$, and $\text{Si}_2(\text{CH}_3)_6$ studied by threshold photoelectron-photoion coincidence spectroscopy. J Phys Chem A, 2006. 110(27): p. 8572-9.
6. Davalos, J.Z., et al., Dissociation dynamics and thermochemistry of tin species, $(\text{CH}_3)_4\text{Sn}$ and $(\text{CH}_3)_6\text{Sn}_2$, by threshold photoelectron-photoion coincidence spectroscopy. J Phys Chem A, 2011. 115(4): p. 402-9.
7. Baytekin, B., H.T. Baytekin, and C.A. Schalley, Mass spectrometric studies of non-covalent compounds: why supramolecular chemistry in the gas phase? Organic & Biomolecular Chemistry, 2006. 4(15): p. 2825-2841.
8. Ninomiya, S., et al., Precise and fast secondary ion mass spectrometry depth profiling of polymer materials with large Ar cluster ion beams. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. 23(11): p. 1601-1606.
9. Herrero, M., et al., Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. Mass Spectrometry Reviews, 2012. 31(1): p. 49-69.
10. Griffiths, W.J. and Y. Wang, Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. Chemical Society Reviews, 2009. 38(7): p. 1882-1896.
11. McDonnell, L.A. and R.M.A. Heeren, Imaging mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews, 2007. 26(4): p. 606-643.
12. Tswett, M.S., *On a New Category of Adsorption Phenomena and their Application to Biochemical Analysis.*, in *Lecture at the March 8 (21), 1903, meeting of the Biological Section of the Warsaw Society of Natural Scientists*. 1903: Warsaw.
13. Dass, C., *Basics of Mass Spectrometry, in Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry* 2006, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-14.
14. Thompson, J.J., *Rays of Positive Electricity and the Application to Chemical Analyses*. London: Longmans, Green and Co. 1913.
15. Nier, A.O., Some reminiscences of mass spectrometry and the Manhattan Project. Journal of Chemical Education, 1989. 66(5): p. 385.
16. Comisarow MB, M.A., The early development of Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) spectroscopy. Journal of Mass Spectrometry, 1996. 31(6): p. 581-5.
17. Sommer, H., H.A. Thomas, and J.A. Hipple, The Measurement of e/m by Cyclotron Resonance. Physical Review, 1951. 82(5): p. 697-702.

18. Jennings, K.R., Collision-induced decompositions of aromatic molecular ions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 1968. 1(3): p. 227-235.
19. Barber, M., et al., Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1981(7): p. 325-327.
20. Fenn, J.B., et al., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989. 246(4926): p. 64-71.
21. Tanaka, K., et al., Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1988. 2(8): p. 151-153.
22. Hu, Q., et al., The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.*, 2005. 40(4): p. 430-43.
23. Rayleigh, L., XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philosophical Magazine Series 5*, 1882. 14(87): p. 184-186.
24. Fernández de la Mora, J., On the Outcome of the Coulombic Fission of a Charged Isolated Drop. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996. 178(1): p. 209-218.
25. Posthumus, M.A., et al., Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules. *Analytical Chemistry*, 1978. 50(7): p. 985-991.
26. Dávalos, J.Z., et al., Anionic Oligomerization of $\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$ and $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$: An Experimental and Computational Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012. 117(3): p. 1495-1501.
27. Guerrero, A., et al., Gas phase acidity measurement of local acidic groups in multifunctional species: Controlling the binding sites in hydroxycinnamic acids. *Journal of the American Chemical Society*, 2013.
28. Baer, T., et al., Dissociation of energy selected $\text{Sn}(\text{CH}_3)_4^+$, $\text{Sn}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^+$, and $\text{Sn}(\text{CH}_3)_3\text{Br}^+$ ions: evidence for isolated excited state dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011. 13(39): p. 17791-17801.
29. Heaton, A.L., R.M. Moision, and P.B. Armentrout, Experimental and Theoretical Studies of Sodium Cation Interactions with the Acidic Amino Acids and Their Amide Derivatives. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2008. 112(15): p. 3319-3327.
30. McDonald, L.A., et al., FTMS structure elucidation of natural products: application to muraymycin antibiotics using ESI multi-CHEF SORI-CID FTMS(n), the top-down/bottom-up approach, and HPLC ESI capillary-skimmer CID FTMS. *Anal Chem*, 2003. 75(11): p. 2730-9.
31. Konishi, Y., et al., Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. *Anal Chem*, 2007. 79(3): p. 1187-97.
32. Dettmer, K., P.A. Aronov, and B.D. Hammock, Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*, 2007. 26(1): p. 51-78.
33. Kind, T. and O. Fiehn, Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical Reviews*, 2010. 2(1-4): p. 23-60.
34. Korfmacher, W.A., Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2005. 10(20): p. 1357-1367.
35. Levsen, K. and H. Schwarz, Gas-phase chemistry of collisionally activated ions. *Mass Spectrometry Reviews*, 1983. 2(1): p. 77-148.

36. Shukla, A.K. and J.H. Futrell, Collisional activation and dissociation of polyatomic ions. *Mass Spectrometry Reviews*, 1993. 12(4): p. 211-255.
37. Marshall, A.G., C.L. Hendrickson, and G.S. Jackson, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews*, 1998. 17(1): p. 1-35.
38. Wong, R.L. and I.J. Amster, Sub Part-Per-Million Mass Accuracy by Using Stepwise-External Calibration in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2006. 17(12): p. 1681-1691.
39. McIver, R.T., Y. Li, and R.L. Hunter, High-resolution laser desorption mass spectrometry of peptides and small proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994. 91(11): p. 4801-4805.
40. Brodbelt, J.S. and J.J. Wilson, Infrared multiphoton dissociation in quadrupole ion traps. *Mass Spectrometry Reviews*, 2009. 28(3): p. 390-424.
41. Gross, J.H., *Tandem Mass Spectrometry*, in *Mass Spectrometry, A Textbook*, Springer, Editor 2011. p. 437-478.
42. Woodin, R.L., D.S. Bomse, and J.L. Beauchamp, Multiphoton dissociation of molecules with low power continuous wave infrared laser radiation. *Journal of the American Chemical Society*, 1978. 100(10): p. 3248-3250.
43. Brehm, B. and E. von Puttkammer, Koinzidensmessung von Photoionen und Photoelektronen bei Methan. *Zeitschrift Für Naturforschung. Teil A, Astrophysik, Physik, Physikalische Chemie*, 1967. 22(1): p. 8.
44. Bodi, A., et al., Imaging photoelectron photoion coincidence spectroscopy with velocity focusing electron optics. *Review of Scientific Instruments*, 2009. 80(3): p. 034101.
45. Paul, W. and H. Steinwedel, A New Mass Spectrometer Without Magnetic Field. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 1953. 8A: p. 448-450.
46. March, R.E. and J.F. Todd, *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*. 1989.
47. Carvalho, A.T.P., et al., Challenges in computational studies of enzyme structure, function and dynamics. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2014. 54(0): p. 62-79.
48. Sun, L., et al., Molecular Dynamics Simulations of the Surface Tension and Structure of Salt Solutions and Clusters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012. 116(10): p. 3198-3204.
49. Rahman, T.S., *Molecular-Dynamics Simulation of Surface Phenomena*, in *Characterization of Materials 2002*, John Wiley & Sons, Inc.
50. Planck, M., Ueber das Gesetz der Energieverteilung im Normalspectrum. *Annalen der Physik*, 1901. 309(3): p. 553-563.
51. Einstein, A. and O. Stern, Einige Argumente für die Annahme einer molekularen Agitation beim absoluten Nullpunkt. *Annalen der Physik*, 1913. 345(3): p. 551-560.
52. Dewar, M.J.S., et al., Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of the American Chemical Society*, 1985. 107(13): p. 3902-3909.
53. Stewart, J.J.P., Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *Journal of Computational Chemistry*, 1989. 10(2): p. 209-220.

54. Szabó, A. and N.S. Ostlund, *Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory*: Dover Publications. 1996.
55. Purvis, G., A full coupled-cluster singles and doubles model: The inclusion of disconnected triples. *J. Chem. Phys.*, 1982. 76(4): p. 1910.
56. Head-Gordon, M. and T. Head-Gordon, Analytic MP2 frequencies without fifth-order storage. Theory and application to bifurcated hydrogen bonds in the water hexamer. *Chemical Physics Letters*, 1994. 220(1-2): p. 122-128.
57. Kohn, W., A.D. Becke, and R.G. Parr, Density Functional Theory of Electronic Structure. *J Phys Chem*, 1996. 100(31): p. 12974-12980.
58. Frisch, M.J., et al., *Gaussian 09, Revision A.01*, 2009: Wallingford CT.
59. Boys, S.F. and F. Bernardi, The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Molecular Physics*, 1970. 19(4): p. 553-566.
60. Curtiss, L.A., et al., Gaussian-3 (G3) theory for molecules containing first and second-row atoms. *The Journal of Chemical Physics*, 1998. 109(18): p. 7764-7776.
61. Curtiss, L.A., P.C. Redfern, and K. Raghavachari, Gaussian-4 theory. *The Journal of Chemical Physics*, 2007. 126(8): p. 084108-12.
62. Juan Z. Dávalos, J.G., Rocío Ramos, Andrés Guerrero and Alexandre F. Lago, Intrinsic (gas-phase) acidity and basicity of paracetamol. *ARKIVOC*, 2014. 2014(2): p. 150-160.
63. Martín-Sómer, A., et al., Can an Amine Be a Stronger Acid than a Carboxylic Acid? The Surprisingly High Acidity of Amine-Borane Complexes. *Chemistry – A European Journal*, 2012. 18(49): p. 15699-15705.
64. Dávalos, J.Z., et al., Acidities of closo-1-COOH-1,7-C₂B₁₀H₁₁ and Amino Acids Based on Icosahedral Carbaboranes. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2014. 118(15): p. 2788-2793.
65. Dávalos, J.Z., et al., A silver complex of chloroquine: synthesis, characterization and structural properties. *New Journal of Chemistry*, 2013. 37(5): p. 1391-1401.
66. Alkorta, I., et al., Static and Dynamic Properties of 1,1'-Bi-2-naphthol and Its Conjugated Acids and Bases. *Chemistry – A European Journal*, 2014. 20(45): p. 14816-14825.
67. Golon, A., et al., Investigating the Thermal Decomposition of Starch and Cellulose in Model Systems and Toasted Bread Using Domino Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. 61(3): p. 674-684.
68. Rodríguez-Bencomo, J.J., et al., Impact of Glutathione-Enriched Inactive Dry Yeast Preparations on the Stability of Terpenes during Model Wine Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014. 62(6): p. 1373-1383.
69. Todd, J.F.J., Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1995. 142(3): p. 209-240.
70. Abboud, J.L., et al., Intrinsic (gas phase) thermodynamic stability of 2-adamantyl cation. Its bearing on the solvolysis rates of 2-adamantyl derivatives. *J Org Chem*, 2002. 67(4): p. 1057-60.
71. Abboud, J.L., et al., Protonation of cubane in the gas phase: a high-level Ab initio and DFT study. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003. 42(9): p. 1044-6.

72. Quintanilla, E., et al., Why does pivalaldehyde (trimethylacetaldehyde) unexpectedly seem more basic than 1-adamantanecarbaldehyde in the gas phase? FT-ICR and high-level ab initio studies. *Chemistry*, 2005. 11(6): p. 1826-32.
73. Davalos, J.Z., et al., Ab initio and experimental thermodynamic and kinetic study of proton-assisted bond activation in gaseous hydrocarbons: deconvolution of reaction efficiencies in the case of adamantane. *Chemistry*, 2006. 12(21): p. 5505-13.
74. Cooks, R.G. and T.L. Kruger, Intrinsic Basicity Determination Using Metastable Ions. *Journal of the American Chemical Society*, 1977. 99(4): p. 1279-1281.
75. McLuckey, S.A., D. Cameron, and R.G. Cooks, Proton Affinities from Dissociations of Proton-Bound Dimers. *Journal of the American Chemical Society*, 1981. 103(6): p. 1313-1317.
76. Cooks, R.G. and P.S.H. Wong, Kinetic Method of Making Thermochemical Determinations: Advances and Applications. *Accounts of Chemical Research*, 1998. 31(7): p. 379-386.
77. Chen, G., P. Wong, and R.G. Cooks, Estimation of Free Radical Ionization Energies by the Kinetic Method and the Relationship between the Kinetic Method and the Hammett Equation. *Analytical Chemistry*, 1997. 69(17): p. 3641-3645.
78. Cheng, X.H., Z.C. Wu, and C. Fenselau, Collision Energy-Dependence of Proton-Bound Dimer Dissociation - Entropy Effects, Proton Affinities, and Intramolecular Hydrogen-Bonding in Protonated Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 1993. 115(11): p. 4844-4848.
79. Wesdemiotis, C., et al., Na⁺ binding to cyclic and linear dipeptides. Bond energies, entropies of Na⁺ complexation, and attachment sites from the dissociation of Na⁺-bound heterodimers and ab initio calculations. *Journal of the American Chemical Society*, 1998. 120(10): p. 2437-2448.
80. Armentrout, P.B., Entropy measurements and the kinetic method: a statistically meaningful approach. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2000. 11(5): p. 371-9.
81. Ervin, K.M., Microcanonical analysis of the kinetic method. The meaning of the "apparent entropy". *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002. 13(5): p. 435-452.
82. Hoke, S.H., et al., Proton Affinities of Free-Radicals Measured by the Kinetic Method. *Journal of the American Chemical Society*, 1994. 116(11): p. 4888-4892.
83. Fazary, A. and Y.-H. Ju, Nonaqueous Solution Studies on the Protonation Equilibria of some Phenolic Acids. *Journal of Solution Chemistry*, 2008. 37(9): p. 1305-1319.
84. Borges, F., et al., Application of a potentiometric system with data-analysis computer programs to the quantification of metal-chelating activity of two natural antioxidants: Caffeic acid and ferulic acid. *Helvetica Chimica Acta*, 2003. 86(9): p. 3081-3087.
85. Baeyer, A., Untersuchungen über die Harnsäuregruppe. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1864. 131(3): p. 291-302.
86. Fischer, E., Mering, J., Über eine neue Klasse von Schlafmitteln. *Therapie der Gegenwart*, 1903. 44: p. 97-101.
87. López Muñoz, F., Ucha Udabe, R., Álamo, C., The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2005. 4: p. 329 - 343.

88. Vijaya Laxmi, S., et al., Synthesis and evaluation of chromenyl barbiturates and thiobarbiturates as potential antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011. 21(14): p. 4329-4331.
89. Faidallah, H.M. and K.A. Khan, Synthesis and biological evaluation of new barbituric and thiobarbituric acid fluoro analogs of benzenesulfonamides as antidiabetic and antibacterial agents. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2012. 142(0): p. 96-104.
90. Cumming, J.B. and P. Kebarle, Summary of gas phase acidity measurements involving acids AH. Entropy changes in proton transfer reactions involving negative ions. Bond dissociation energies D(A-H) and electron affinities EA(A). *Can. J. Chem.*, 1978. 56(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 1-9.
91. Linstrom, P.J. and W.G. Mallard, *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg MD*.
92. Pople, J.A., M. Head-Gordon, and K. Raghavachari, Quadratic configuration interaction. A general technique for determining electron correlation energies. *J Chem Phys*, 1987. 87(10): p. 5968-5975.
93. Purvis, G.D. and R.J. Bartlett, A full coupled-cluster singles and doubles model: The inclusion of disconnected triples. *J Chem Phys*, 1982. 76(4): p. 1910-1918.
94. Ervin, K.M., Microcanonical analysis of the kinetic method. The meaning of the "apparent entropy". *Journal of Mass Spectrometry*, 2002. 13(5): p. 435-452.
95. *NIST Chemistry Webbook. Standard Reference Database Number 69*, 2012, P.J. Linstrom, W.G. Mallard, Release June 2005: National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899 (<http://webbook.nst.gov>).
96. Németh, B., et al., Differences Between Amine- and Phosphine-Boranes: Synthesis, Photoelectron Spectroscopy, and Quantum Chemical Study of the Cyclopropylic Derivatives. *Inorganic Chemistry*, 2010. 49(11): p. 4854-4864.
97. Abboud, J.-L.M., et al., Dihydrogen Generation from Amine/Boranes: Synthesis, FT-ICR, and Computational Studies. *Chemistry – A European Journal*, 2012. 18(13): p. 3981-3991.
98. Marenich, A.V., C.J. Cramer, and D.G. Truhlar, Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009. 113(18): p. 6378-6396.
99. Choi, J.-H., et al., Chloroquine enhances the chemotherapeutic activity of 5-fluorouracil in a colon cancer cell line via cell cycle alteration. *APMIS*, 2012. 120(7): p. 597-604.
100. Papakrivov, J., J.M. Sá, and T.E. Wellems, Functional Characterization of the *Plasmodium falciparum* Chloroquine-Resistance Transporter (PfCRT) in Transformed *Dictyostelium discoideum* Vesicles. *PLoS ONE*, 2012. 7(6): p. e39569.
101. Thompson, K.H. and C. Orvig, Boon and Bane of Metal Ions in Medicine. *Science*, 2003. 300(5621): p. 936-939.
102. Crouch, P.J. and K.J. Barnham, Therapeutic Redistribution of Metal Ions To Treat Alzheimer's Disease. *Accounts of Chemical Research*, 2012. 45(9): p. 1604-1611.
103. Scholz, M. and E. Hey-Hawkins, Carbaboranes as Pharmacophores: Properties, Synthesis, and Application Strategies. *Chemical Reviews*, 2011. 111(11): p. 7035-7062.

104. Campo, F., M. Mossotti, and L. Panza, Synthesis of Complex Glycosylated Carboranes for BNCT. *Synlett*, 2012. 2012(01): p. 120-122.
105. Wyttenbach, T. and M.T. Bowers, Intermolecular Interactions in Biomolecular Systems Examined by Mass Spectrometry. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2007. 58(1): p. 511-533.
106. Muhammad, S., et al., Quantum Mechanical Design and Structure of the Li@B10H14 Basket with a Remarkably Enhanced Electro-Optical Response. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. 131(33): p. 11833-11840.
107. Becke, A.D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys*, 1993. 98(7): p. 5648-5652.
108. Lee, C., W. Yang, and R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*, 1988. 37(2): p. 785-789.
109. Narancic, S., A. Bach, and P. Chen, Simple Fitting of Energy-Resolved Reactive Cross Sections in Threshold Collision-Induced Dissociation (T-CID) Experiments. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2007. 111(30): p. 7006-7013.
110. Oliva, J.M., et al., Energy landscapes in diexo and exo/endo isomers derived from Li2B12H12. *Chemical Physics Letters*, 2010. 497(4-6): p. 172-177.
111. Sahnoun, R., S. Koseki, and Y. Fujimura, Theoretical investigation of 1,1'-bi-2-naphthol isomerization. *Journal of Molecular Structure*, 2005. 735-736(0): p. 315-324.
112. Allen, F., The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallographica Section B*, 2002. 58(3 Part 1): p. 380-388.
113. Pérez, P.J., *Alkane C-H Activation by Single-Site Metal Catalysis*. 2012.
114. Shilov, A.E. and G.B. Shul'pin, Activation of C-H Bonds by Metal Complexes. *Chemical Reviews*, 1997. 97(8): p. 2879-2932.
115. Simoes, J.A.M. and J.L. Beauchamp, Transition metal-hydrogen and metal-carbon bond strengths: the keys to catalysis. *Chemical Reviews*, 1990. 90(4): p. 629-688.
116. Al Takhin, G., H.A. Skinner, and A.A. Zaki, Microcalorimetric studies on the thermal decomposition of platinum and palladium complexes containing phosphine or diene ligands. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1984(3): p. 371-378.
117. Miedaner, A., et al., Thermodynamic Studies of [HPt(EtXantphos)2]⁺ and [(H)2Pt(EtXantphos)2]²⁺. *Organometallics*, 2004. 23(11): p. 2670-2679.
118. Lersch, M. and M. Tilset, Mechanistic Aspects of C-H Activation by Pt Complexes. *Chemical Reviews*, 2005. 105(6): p. 2471-2526.
119. Zhao, Y. and D. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2008. 120(1-3): p. 215-241.
120. Marrone, A., N. Re, and R. Romeo, Dissociative Route to C-H Bond Activation: DFT Study of Ligand Cyclometalation in a Platinum(II) Complex. *Organometallics*, 2008. 27(10): p. 2215-2222.

121. Escudero, A., et al., Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*, 2002. 77(3): p. 325-331.
122. Ferreira, V., et al., Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 1997. 205(5): p. 392-396.
123. Ugliano, M., et al., Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon blanc Wines. Effect of Glutathione, Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. 59(6): p. 2564-2572.
124. Pozo-Bayón, M.Á., et al., Wine Features Related to Safety and Consumer Health: An Integrated Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2011. 52(1): p. 31-54.
125. Battin, E. and J. Brumaghim, Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2009. 55(1): p. 1-23.
126. Brown, S.C., G. Kruppa, and J.-L. Dasseux, Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 2005. 24(2): p. 223-231.
127. Simões, J., et al., Identification of Anomeric Configuration of Underivatized Reducing Glucopyranosyl-glucose Disaccharides by Tandem Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. *Analytical Chemistry*, 2007. 79(15): p. 5896-5905.
128. Hernández-Hernández, O., et al., Determination of Free Inositols and Other Low Molecular Weight Carbohydrates in Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. 59(6): p. 2451-2455.
129. Pizzoferrato, L., M. Paci, and G. Rotilio, Structural Modification and Bioavailability of Starch Components As Related to the Extent of Maillard Reaction: An Enzymatic Degradation and a Solid-State ¹³C CPMAS NMR Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998. 46(2): p. 438-441.
130. Abdel-Aal, E.-S.M. and I. Rabalski, Effect of baking on nutritional properties of starch in organic spelt whole grain products. *Food Chemistry*, 2008. 111(1): p. 150-156.
131. Tizzotti, M.J., et al., New ¹H NMR Procedure for the Characterization of Native and Modified Food-Grade Starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. 59(13): p. 6913-6919.
132. LC., M., Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. *Comptes Rendus Chimie*, 1912. 154: p. 66-68.
133. Wei, C., et al., Comparison of the crystalline properties and structural changes of starches from high-amylose transgenic rice and its wild type during heating. *Food Chemistry*, 2011. 128(3): p. 645-652.
134. Hertkorn, N., et al., Natural Organic Matter and the Event Horizon of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2008. 80(23): p. 8908-8919.
135. Hughey, C.A., et al., Kendrick Mass Defect Spectrum: A Compact Visual Analysis for Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra. *Analytical Chemistry*, 2001. 73(19): p. 4676-4681.

136. Lunsford, K.A., G.F. Peter, and R.A. Yost, Direct Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Imaging of Cellulose and Hemicellulose in Populus Tissue. *Analytical Chemistry*, 2011. 83(17): p. 6722-6730.
137. Karaköse, H., R. Jaiswal, and N. Kuhnert, Characterization and Quantification of Hydroxycinnamate Derivatives in Stevia rebaudiana Leaves by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. 59(18): p. 10143-10150.
138. Jaiswal, R., J. Kiprotich, and N. Kuhnert, Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry*, 2011. 72(8): p. 781-790.
139. Drynan, J.W., et al., The chemistry of low molecular weight black tea polyphenols. *Natural Product Reports*, 2010. 27(3).
140. Kurimoto, A., et al., Analysis of Energy-Resolved Mass Spectra at MSn in a Pursuit To Characterize Structural Isomers of Oligosaccharides. *Analytical Chemistry*, 2006. 78(10): p. 3461-3466.
141. Daikoku, S., et al., Anomeric information obtained from a series of synthetic trisaccharides using energy resolved mass spectra. *Journal of Mass Spectrometry*, 2007. 42(6): p. 714-723.
142. Daikoku, S., et al., Discrimination of 16 structural isomers of fucosyl galactoside based on energy-resolved mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2007. 18(10): p. 1873-1879.
143. Clifford, M.N., Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000. 80(7): p. 1033-1043.
144. Kono, Y., et al., Antioxidant activity of polyphenolics in diets: Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1997. 1335(3): p. 335-342.
145. Stich, H.F., M.P. Rosin, and L. Bryson, Inhibition of mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffee and tea. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1982. 95(2–3): p. 119-128.
146. Kanie, O., et al., Multi-stage mass spectrometric information obtained by deconvolution of energy-resolved spectra acquired by triple-quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011. 25(11): p. 1617-24.
147. Clifford, M.N., S. Knight, and N. Kuhnert, Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. 53(10): p. 3821-3832.
148. Smith, S., *Unimolecular Reaction Dynamics: Theory and Experiments* (Baer, Tomas; Hase, William L.). *Journal of Chemical Education*, 1998. 75(9): p. 1098.
149. *Encyclopedic Reference of Traditional Chinese Medicine*, ed. X. Yang New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2003.
150. Dung, N.T., et al., PHENOLIC CONTENTS, ANTIOXIDANT AND TYROSINASE INHIBITORY ACTIVITIES OF LONICERA JAPONICA THUMB. *Journal of Food Biochemistry*, 2011. 35(1): p. 148-160.

151. Lim, T.K., *Lonicera japonica*, in *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants* 2014, Springer Netherlands. p. 656-680.
152. Lee, E.J., et al., Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. *Food Chemistry*, 2010. 120(1): p. 134-139.
153. Seo, O.N., et al., Determination of polyphenol components of *Lonicera japonica* Thunb. using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Contribution to the overall antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2012. 134(1): p. 572-577.
154. Scalbert, A., et al., Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005. 45(4): p. 287-306.
155. Clifford, M.N., et al., Hierarchical Scheme for LC-MSⁿ Identification of Chlorogenic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51(10): p. 2900-2911.
156. Jaiswal, R. and N. Kuhnert, Identification and Characterization of Two New Derivatives of Chlorogenic Acids in *Arnica* (*Arnica montana* L.) Flowers by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. 59(8): p. 4033-4039.

ANEXO

A continuación se muestra una relación de las publicaciones en las que el doctorando figura como coautor. Los artículos que han sido comentados en la presente tesis están incluidos al final en orden cronológico de publicación.

- Juan Z. Dávalos, Javier González, Andrés Guerrero, Drahomír Hnyk, Josef Holub, and Josep M. Oliva, '**Anionic Oligomerization of Li₂[B12h12] and Li[Cb11h12]: An Experimental and Computational Study**', *The Journal of Physical Chemistry C*, 117 (2012), 1495-501.
- Juan Z. Dávalos, Alexandre F. Lago, José C. S. Costa, Luís M. N. B. F. Santos, and Javier González, '**Thermochemical and Structural Properties of Dman-“Proton Sponges”**', *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 54 (2012), 346-51.
- Agnieszka Golon, Francisco Javier González, Juan Z. Dávalos, and Nikolai Kuhnert, '**Investigating the Thermal Decomposition of Starch and Cellulose in Model Systems and Toasted Bread Using Domino Tandem Mass Spectrometry**', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (2012), 674-84.
- Ana Martín-Sómer, Al Mokhtar Lamsabhi, Manuel Yáñez, Juan Z. Dávalos, Javier González, Rocío Ramos, and Jean-Claude Guillemin, '**Can an Amine Be a Stronger Acid Than a Carboxylic Acid? The Surprisingly High Acidity of Amine-Borane Complexes**', *Chemistry – A European Journal*, 18 (2012), 15699-705.
- Juan Z. Dávalos, Javier Gonzalez, Andres Guerrero, Ana C. Valderrama-Negron, Larry D. Aguirre Mendez, Rosa M. Claramunt, Dolores Santa Maria, Ibon Alkorta, and Jose Elguero, '**A Silver Complex of Chloroquine: Synthesis, Characterization and Structural Properties**', *New Journal of Chemistry*, 37 (2013), 1391-401.
- Andres Guerrero, Tomas Baer, Antonio Chana, Javier González, and Juan Z. Dávalos, '**Gas Phase Acidity Measurement of Local Acidic Groups in Multifunctional Species: Controlling the Binding Sites in Hydroxycinnamic Acids**', *Journal of the American Chemical Society*, 135 (2013), 9681-90.
- Ibon Alkorta, Céline Cancedda, Emilio José Cocinero, Juan Z. Dávalos, Patrica Écija, José Elguero, Javier González, Alberto Lesarri, Rocío Ramos, Felipe Reviriego, Christian Roussel, Iciar Uriarte, and Nicolas Vanthuyne, '**Static and Dynamic**

Properties of 1,1'-Bi-2-Naphthol and Its Conjugated Acids and Bases', *Chemistry – A European Journal*, 20 (2014), 14816-25.

- Juan Z. Dávalos, Javier González, Rocío Ramos, Drahomír Hnyk, Josef Holub, J. Arturo Santaballa, Moisés Canle-L, and Josep M. Oliva, '**Acidities of Closo-1-CooH-1,7-C₂b₁₀H₁₁ and Amino Acids Based on Icosahedral Carbaboranes**', *The Journal of Physical Chemistry A*, 118 (2014), 2788-93.
- Javier González Juan Z. Dávalos, Rocío Ramos, Andrés Guerrero and Alexandre F. Lago, '**Intrinsic (Gas-Phase) Acidity and Basicity of Paracetamol**', *ARKIVOC*, 2014 (2014), 150-60.
- Juan José Rodríguez-Bencomo, Inmaculada Andújar-Ortiz, M. Victoria Moreno-Arribas, Carolina Simó, Javier González, Antonio Chana, Juan Dávalos, and M. Ángeles Pozo-Bayón, '**Impact of Glutathione-Enriched Inactive Dry Yeast Preparations on the Stability of Terpenes During Model Wine Aging**', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014), 1373-83.

Anionic Oligomerization of $\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$ and $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$: An Experimental and Computational Study

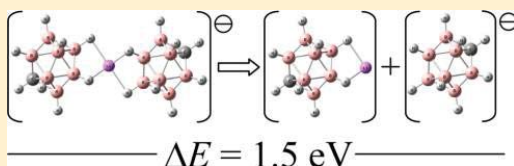
Juan Z. Dávalos,^{*,†} Javier González,[†] Andrés Guerrero,[†] Drahomír Hnyk,[‡] Josef Holub,[‡] and Josep M. Oliva^{*,†}

[†]Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, C/Serrano, 119, E-28006 Madrid, Spain

[‡]Institute of Inorganic Chemistry of the ASCR, v.v.i., 250 68 Husinec-Řež, Czech Republic

Supporting Information

ABSTRACT: We present an experimental and computational study of the oligomerization in icosahedral *closo*-(car)boranes $\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$ (I) and $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$ (II). The experiments were performed on a hybrid ESI-TQ-FT-ICR mass spectrometer equipped with a 7.0 T superconducting magnet. The computational study consisted of finding energy minimum structures for the molecules I, II and the derived anions $[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]^{2-}$, $[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]^-$, $[\text{I}_2-\text{Li}]^-$, and $[\text{II}_2-\text{Li}]^-$, as well as an estimate for the dissociation energy in the processes $[\text{X}_2-\text{Li}]^- \rightarrow \text{X} + [\text{X}-\text{Li}]^-$ with $\text{X} = \text{I}, \text{II}$. Comparison of experiments and computations shows an excellent agreement for the bond dissociation energy in the process $[\text{II}_2-\text{Li}]^- \rightarrow \text{II} + [\text{II}-\text{Li}]^-$ with $\Delta E = 1.5 \text{ eV}$.



1. INTRODUCTION

Polyhedral heteroboranes show a rich variety of molecular architectures with a wide variety of applications ranging from biosciences¹ and medicine² (boron neutron capture therapy, BNCT) to materials sciences.³ The large stability of some polyhedral closed (*closo*) heteroborane cages, particularly icosahedral,^{4–7} make them ideal candidates for experimental and computational studies of “soft” interactions with biomolecules.⁸ Synthesis and structural characterization of alkali metal complexes derived from carbanions,⁹ or the (quantum-chemical studied) interaction between Li^+ and icosahedral $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$ and $\text{CB}_{11}\text{H}_{12}^-$ cage anions, may be relevant for understanding alkali metal reaction mechanisms inside and outside heteroborane cages.^{10,11} Controlled Li-release inside an heteroborane molecular architecture might also be relevant for medical and new materials sciences, such as nonlinear optics (NLO), given the remarkable enhanced computed electro-optical response of the endohedral complex $\text{Li}@\text{B}_{10}\text{H}_{14}$.¹² Such systems may evoke the possibility to explore a new thriving area, that is, alkali-metal-boranes for NLO applications.

In this work, we study experimentally (using MS spectrometry), and by means of computational modeling, the energies and modes of interaction in icosahedral (car)borane cages $\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$ and $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$ in the anionic mode.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Materials and Instrumentation. Samples of $\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$ and $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$ were provided by Dr. D. Ellis and Prof. A. J. Welch of Heriot-Watt University, UK. $\text{Li}_2\text{B}_{12}\text{H}_{12}$ (I) and $\text{LiCB}_{11}\text{H}_{12}$ (II) were dissolved in acetonitrile (50–250 μM). The manipulation of the samples was performed inside of an argon drybox to minimize potential decomposition processes.

The experiments were carried out on a Triple Quadrupole mass spectrometer (TQ) Agilent/Varian MS-320 equipped

with an electrospray ionization source (ESI) and coupled to a Fourier transform ion cyclotron resonance spectrometer (FT-ICR) Agilent/Varian 920 provided with a 7.0 T superconducting magnet. Sample solutions were directly infused into the ESI source at 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ of flow rate in the negative mode. The ESI needle voltage was maintained at -3.5 kV , and the capillary voltage was kept at -72 V . Nitrogen was used as the drying gas, and compressed air was used as the nebulizer gas. The ion source and drying gas temperatures were kept at 42 and 140 $^\circ\text{C}$, respectively.

2.2. CID Experiments. The dissociation experiments were performed in TQ-spectrometer by isolating the desired anions in the first quadrupole (Q1) with a peak width including the signal of the main boron ionic isotopes. The isolated ions were allowed to undergo collision induced dissociation (CID) with argon gas leaked into a curved (90 $^\circ$) collision chamber (Q2) at a pressure of 1.4 mTorr. The geometry of Q2 reduces the background noise and increases the signal-to-noise ratio. The dissociation product ions were finally analyzed with the third quadrupole (Q3). The CID experiments were performed at 16 different collision energies, corresponding to the center-of-mass energies (E_{cm}) of 0.25–4 eV in 0.25 eV steps. The center-of-mass energy was calculated using the equation $E_{\text{cm}} = E_{\text{lab}}[m/(M + m)]$, where E_{lab} is the ion kinetic energy in the laboratory frame, m is the mass of the collision gas (argon), and M is the mass of the anion. The final intensities of the dissociation product ions were determined as the average of 100 measurements of one second of detection.

2.3. High-Resolution Experiments. High-resolution mass spectrometry measurements of $\text{Li}_2[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]$ and $\text{Li}[\text{CB}_{11}\text{H}_{12}]$ were performed by FT-ICR. The anions, produced in the

Received: October 16, 2012

Revised: December 17, 2012

Published: December 20, 2012



Thermochemical and structural properties of DMAN-“proton sponges”

Juan Z. Dávalos^{a,*}, Alexandre F. Lago^b, José C.S. Costa^c, Luís M.N.B.F. Santos^c, Javier González^a

^a Instituto de Química-Física “Rocasolano”, CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

^b Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, 09210-170 Santo André, SP, Brazil

^c Centro de Investigação em Química, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 687, P-4169-007 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2012

Received in revised form 9 May 2012

Accepted 13 May 2012

Available online 31 May 2012

Keywords:

Proton-sponges

Amino-naphthalenes

Superbasicity

Isodesmic reactions

Enthalpy

Combustion

Sublimation

ABSTRACT

We report a study on the energetics and structural properties of naphthalene-based proton sponges and their corresponding protonated cations. In particular, we have determined the experimental standard enthalpies of formation in the gas phase at $T = 298.15$ K, $\Delta_f H_m^\circ(\text{g})$, for the neutral and protonated DMAN [1,8-bis (dimethylamino)-naphthalene], (221.0 ± 7.3) and (729.0 ± 11.1) $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. A reliable experimental estimation of enthalpy associated with “strain” effect and hydrogen bond intramolecular (included within “enhanced basicity”, *EB*) contributions to the basicity of DMAN, were deduced from isodesmic reactions, $-(29.1 \pm 4.6)$ and (87.1 ± 11.9) $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. The gas-phase basicities (*GB*) of naphthalene-based proton sponges are compared with the corresponding aqueous basicities (pK_a), covering a range of 149 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ in *GB* and 11.5 in pK_a . Density functional calculations at the M05-2X/6-311++G(d,p) level of theory were used to check the consistency of the experimental results and also to estimate the unavailable *GB* values of the considered species.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Proton sponges are aromatic and cyclic diamides with exceptionally high basicity (superbasicity). The most popular proton sponge, 1,8-bis (dimethylamino) naphthalene (DMAN) was reported for the first time in 1968 by Alder *et al.* [1]. These compounds have two intramolecular basic centres, usually amine sites closely positioned that can share a proton to form a strong $[\text{N}\cdots\text{H}\cdots\text{N}]^+$ hydrogen bond. A large number of “proton sponges” have been synthesized (by Staab [2], Alder [3], Schwesinger [4], Verkade [5] and other research groups [6]) and their properties extensively characterized and studied by means experimental [7] and computational methods. Several reviews have also been published on these compounds [8]. The possible causes of the dramatic increase in basicity of proton sponges are not sufficiently clarified, although they are most likely related to a combination of factors such as destabilization of neutral molecule by repulsion of the unshared electron pairs, formation of strong intramolecular hydrogen bond in the protonated form, and relief of the steric strain upon protonation. There is a continuing debate about what is the main cause of enhanced basicity of these compounds [9–11].

Despite its fundamental and applied relevance [12,13], the experimental thermochemical data of proton sponges, including DMAN and its derivatives, is incomplete. Herein we report the

experimental determination of standard enthalpy of formation, in the gas phase, $\Delta_f H_m^\circ(\text{g})$, of DMAN (**1**, figure 1) by using static micro-bomb combustion calorimetry, for the determination of standard enthalpy of formation, in solid phase, $\Delta_f H_m^\circ(\text{cd})$, Calvet microcalorimetry, for the determination of standard enthalpy of sublimation, $\Delta_{\text{cd}}^s H_m^\circ$, and the static apparatus, for the determination of the liquid vapour pressures at different temperatures, and to derive the standard enthalpy of vaporization, $\Delta_v^s H_m^\circ$. The value of $\Delta_f H_m^\circ(\text{g})$ is used to estimate, (i) the stability of its protonated form (**1H**⁺, figure 1), (ii) the “strain effect” in neutral molecule and (iii) the contribution of intramolecular hydrogen bond and other effects to the enhancement of its basicity. This study, extended to 1,8-diamino-naphthalene (**2**), was basically done by means of isodesmic reactions which combined experimental energetic data of the available reference compounds with theoretical results obtained by M05-2X density functional theory. We also have established a relationship of basicities between gaseous and dissolution phases of the naphthalene-based proton sponges including N-alkyl and *ortho/para*-electron donor/acceptor substituents.

2. Experimental

2.1. Materials, purity control. DSC measurements

The 1,8-bis (dimethylamino) naphthalene (**1**, Proton Sponge, DMAN, CAS 20734-58-1) was purchased from Aldrich, carefully dried under vacuum at room temperature and used without

* Corresponding author. Tel.: +34 91 5619 400.

E-mail address: jdavalos@iqfr.csic.es (J.Z. Dávalos).

Investigating the Thermal Decomposition of Starch and Cellulose in Model Systems and Toasted Bread Using Domino Tandem Mass Spectrometry

Agnieszka Golon,[†] Francisco Javier González,[§] Juan Z. Dávalos,[§] and Nikolai Kuhnert^{*,†}

[†]School of Engineering and Science, Jacobs University Bremen, Campus Ring 1, 28759 Bremen, Germany

[§]Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Many dietary products containing polysaccharides, mostly starch and cellulose, are processed by thermal treatment. Similarly to the formation of caramel from mono- and disaccharides, the chemical structure of the carbohydrates is dramatically altered by heat treatment. This contribution investigates the products of thermal decomposition of pure starch and cellulose as model systems followed by an investigation of bread obtained at comparable conditions using a combination of modern mass spectrometry techniques. From both starch and cellulose, dehydrated oligomers of glucose and dehydrated glucose have been predominately observed, with oligomers of more than four glucose moieties dominating. Moreover, disproportionation and oligomers with up to six carbohydrates units are formed through unselective glycosidic bond breakage. MALDI-MS data confirm the presence of the majority of products in toasted bread.

KEYWORDS: browning, starch, cellulose, complex mixtures, mass spectrometry

INTRODUCTION

Carbohydrates, the most abundant biomolecules in nature, are present in all living system as monosaccharides or combined as polysaccharides,¹ playing an important role as structural material and energy reserves.² All foods of plant origin contain polysaccharides in abundance. Starch and cellulose are the two most common polysaccharides present in dietary plants, consisting of glucose connected via α -1,4- and β -1,4-glycosidic bonds, respectively.³ In particular, starch is observable in various dietary plant sources (e.g., corn, potato, wheat, and rice)^{4,5} being the most important source of chemical energy in food as well as the predominant contributor to energy intake in a typical human diet.^{6–8}

Most foods are consumed by humans after thermal treatment including cooking, baking, frying, or roasting. In the process of these thermal treatments all carbohydrates in food undergo significant chemical changes frequently described as non-enzymatic browning reactions. In the field of carbohydrate chemistry the best-known examples are the thermal conversion of glucose and sucrose to caramel and the Maillard reaction between saccharides and amino acids at elevated temperatures, forming a material referred to as melanoidins. Melanoidins are present in all thermally treated carbohydrate-rich foods with their daily human intake from all dietary sources estimated by Fogliano and Morales at 10 g per day.⁹ Melanoidins are composed of reaction products arising from thermal treatment of carbohydrates alone and from reaction products of carbohydrates with nitrogen-containing species including amino acids and proteins. Despite many advances, the molecular composition of melanoidins and the mechanism of formation of thermally treated carbohydrates must be considered as sketchy. This fact is closely linked to the limitations of analytical chemistry, which in the past, due to

restrictions in resolving power, has struggled to provide methods capable of analyzing extremely complex materials containing thousands of individual analytes.

Recently, modern mass spectrometry has evolved as a technique able to overcome these limitations and provide for the first time detailed insight into the myriad compounds formed in food processing providing both structural information and mechanistic information. We have developed an analytical strategy, which we have termed domino tandem mass spectrometry. In a first step we take advantage of the ultimate resolving power of ultrahigh-resolution mass spectrometry (MS) to count all detectable analytes within the sample and provide extensive lists of molecular formulas present in the sample. Using graphical and chemometric tools such as van Krevelen analysis, Kendrick analysis, or homologous series analysis, the experimental data set is exploited to establish a structural and mechanistic model accounting for all chemical processes in the sample. In a second consecutive step (therefore the term domino tandem) using LC-tandem MS, the structural hypothesis is verified or not. Using LC-tandem MS, it is possible to resolve isomeric compounds in the chromatographic dimension and obtain valuable structural information based on fragment spectra. We have applied this approach to the analysis of black tea thearubigin formation,¹⁰ to the formation of roasted coffee melanoidins,¹¹ and recently to the investigation of caramel formed from glucose, fructose, and sucrose.¹² In this contribution we apply our analytical strategy to the investigation of thermal decomposition products obtained

Received: May 16, 2012

Revised: October 27, 2012

Accepted: December 20, 2012

Published: December 20, 2012



Can an Amine Be a Stronger Acid than a Carboxylic Acid? The Surprisingly High Acidity of Amine–Borane Complexes

Ana Martín-Sómer,^[a] Al Mokhtar Lamsabhi,^[a] Manuel Yáñez,^{*,[a]} Juan Z. Dávalos,^{*,[b]} Javier González,^[b] Rocío Ramos,^[b] and Jean-Claude Guillemin^{*,[c]}

Abstract: The gas-phase acidity of a series of amine–borane complexes has been investigated through the use of electrospray mass spectrometry (ESI-MS), with the application of the extended Cooks kinetic method, and high-level G4 ab initio calculations. The most significant finding is that typical nitrogen bases, such as aniline, react with BH₃ to give amine–borane complexes, which, in the gas phase, have acidities as high as those of either phosphoric, oxalic, or salicylic acid; their acidity is higher than many carboxylic acids, such as formic, acetic, and propanoic acid. Indeed the complexation of different amines with BH₃

leads to a substantial increase (from 167 to 195 kJ mol^{−1}) in the intrinsic acidity of the system; in terms of ionization constants, this increase implies an increase as large as fifteen orders of magnitude. Interestingly, this increase in acidity is almost twice as large as that observed for the corresponding phosphine–borane analogues. The agreement between the experimental and the G4-based calculated values is

Keywords: ab initio calculations • acidity • amine–borane complexes • electrospray mass spectrometry • extended Cooks kinetic method

excellent. The analysis of the electron-density rearrangements of the amine and the borane moieties indicates that the dative bond is significantly stronger in the *N*-deprotonated anion than in the corresponding neutral amine–borane complex, because the deprotonated amine is a much better electron donor than the neutral amine. On the top of that, the newly created lone pair on the nitrogen atom in the deprotonated species, conjugates with the BN bonding pair. The dispersion of the extra electron density into the BH₃ group also contributes to the increased stability of the deprotonated species.

Introduction

There are many interactions in chemistry, from van der Waals complexes to dative bonds, including hydrogen bonds,^[1–3] halogen bonds,^[4–7] and beryllium bonds,^[8,9] which involve closed-shell systems. One of the common characteristics of these interactions, with the only exception being the van der Waals complexes, is that there is a charge transfer, to either a large or a small extent, between the interacting

subunits. In the case of the X–H...Y hydrogen bonds (HBs), this charge transfer involves the transfer of electron density from the lone pairs of the HB acceptor, Y, into the σ_{XH}^* antibonding orbital of the HB donor, and it is responsible for the elongation of the X–H bond and the red shifting of the X–H stretching band. For beryllium compounds, B:BeX₂, electron density is transferred from the lone pairs of the Lewis base, B, into both the empty 2p orbital of the Be atom and the σ_{BeX}^* antibonding orbital.^[8] The consequences of these charge transfers are the bending of the BeX₂ moiety and the significant elongation of the Be–X bonds. Hence, one important common feature of these interactions between closed-shell systems is that the deformation of the interacting subunits usually triggers significant, even dramatic, changes in their chemical properties. This change in chemical properties has been found in the case of many complexes involving BH₃ and some of its derivatives, for which these interactions are particularly strong.^[10–15] The important point we want to emphasize here is that the deformation plays a crucial role when these complexes are formed, so that the strength of the interaction actually can only be correctly rationalized by taking into account the effects that the deformation has on the donor and the acceptor properties of the interacting systems.^[16,17] Only when these effects are accounted for is it then possible to explain, for instance, why BH₂F and BHF₂ are weaker Lewis acids than BH₃, whereas boron trifluoride is a stronger acid than borane.^[16]

[a] A. Martín-Sómer, Dr. A. M. Lamsabhi, Prof. M. Yáñez
Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Módulo 13.
Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco,
28049-Madrid (Spain)
Fax: (+34) 91-497-5238
E-mail: manuel.yanez@uam.es

[b] Dr. J. Z. Dávalos, J. González, R. Ramos
Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC. C/Serrano,
119.28006 Madrid (Spain)
Fax: (+34) 91-564-2431
E-mail: jdavalos@iqfr.csic.es

[c] Dr. J.-C. Guillemin
Institut des Sciences Chimiques de Rennes,
UMR 6226 CNRS-ENSCR
Avenue du Général Leclerc, CS 50837, 35708 Rennes (France)
Fax: (+33) 223-23-81-08
E-mail: jean-claude.guillemin@ensc-rennes.fr

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201202192>.

The charge redistribution, which occurs upon the formation of the aforementioned dative bonds, results in changes in the chemical properties of the interacting systems, changes that affect, in particular, their intrinsic reactivity. A paradigmatic example is the change that phosphines undergo when they form the corresponding phosphine–borane complexes. Whereas the free phosphines are usually pyrophoric, phosphine–borane complexes are not at all pyrophoric and are much less volatile; but what is more important is that they are much stronger acids in the gas phase.^[11,14]

Amine–borane complexes have received lately a lot of attention as potential devices for hydrogen storage^[18,19] and because they exhibit diverse types of reactivity. They are useful borane sources in many reactions that are carried out in either aqueous or alcoholic solvents. They can also be converted into aminoboranes through dehydrogenation processes,^[20–23] which involve, in some cases, frustrated Lewis pairs^[24] and can be used for the quantitative analysis of amines.^[25] Aliphatic and heterocyclic amine–borane complexes exhibit potent cytotoxic activity in vitro and in vivo against murine and human tumor models, because these compounds were shown to inhibit DNA synthesis.^[26] They may also act as alternative reducing agents,^[27–29] in particular for reductive alkylation of proteins.^[30] They can play important roles in heterogeneous catalysis and in nanoscience.^[31,32] Very recently, it has been shown that the gas-phase protonation of amine–borane complexes leads in all cases to the formation of dihydrogen.^[19] Our aim was to show that intrinsic acidity is an important characteristic of amine–borane complexes. Herein, we show, using a combined experimental and theoretical study, that typical conventional bases such as aniline become acidic—with acidities as high as phosphoric acid—when they form complexes with borane, whereas the acidity of other nitrogen bases, such as dimethylamine, aziridine, and cyclopropylamine, becomes as high as that of formic, acetic, and propionic acids.

Experimental Section

Materials: Ammonia borane and dimethylamine borane were purchased from Aldrich and used without further purification. The syntheses of methylamine borane,^[33] aziridine borane,^[34] allylamine borane,^[19,35] propargylamine borane,^[19] cyclopropylamine borane,^[36] trifluoroethylamine borane,^[19] and aniline borane^[37] have already been reported in the literature.

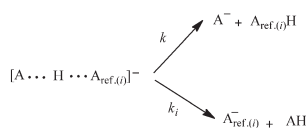
Determination of gas-phase acidities (ΔG^0_{acid}), deprotonation enthalpies (ΔH^0_{acid}), and deprotonation entropies (ΔS^0_{acid}): The gas-phase acidity of a protic acid (AH), $\Delta G^0_{\text{acid}}(\text{AH})$, is defined as the Gibbs free-energy change for reaction 1. The corresponding enthalpy and entropy changes are referred to as gas-phase deprotonation enthalpy (ΔH^0_{acid}) and deprotonation entropy (ΔS^0_{acid}), respectively.



Extended Cooks kinetic method (EKM): The acidity, deprotonation enthalpy, and deprotonation entropy of amine–borane complexes have been experimentally determined by means of the “extended kinetic method” (EKM)^[38–46] using a triple-quadrupole mass spectrometer

(Varian MS-320) with an electrospray source (ESI).

EKM is an improved version of the simple Cooks kinetic method^[47–50] which takes into account entropic effects on the competitive dissociations of a mass-selected proton-bound heterodimer anion, $[\text{A} \cdot \text{H} \cdot \text{A}_{\text{ref}(i)}]^-$ generated in the gas phase, where AH is the amine–borane complex under investigation and $\text{A}_{\text{ref}(i)}\text{H}$ is a set of conjugate bases of reference acids with known gas-phase acidity values. The heterodimers $[\text{A} \cdot \text{H} \cdot \text{A}_{\text{ref}(i)}]^-$ are accelerated and undergo collision-induced dissociation (CID) in a collision cell of the spectrometer. The CID process may give rise to two deprotonated species, A^- and $\text{A}_{\text{ref}(i)}^-$, via the two competitive dissociation channels with rate constants k and k_i , respectively (see Scheme 1).



Scheme 1. Collision-induced dissociations of $[\text{A} \cdot \text{H} \cdot \text{A}_{\text{ref}(i)}]^-$.

If the concentration of the secondary fragment anions is negligible, the starting point of the kinetic method is to assume that the ratio of measured peak intensities $[\text{A}^-]/[\text{A}_{\text{ref}(i)}^-]$ is equal to the ratio of rate constants k/k_i . Then, assuming no-reverse activation energy, the acidities of AH and $\text{A}_{\text{ref}(i)}\text{H}$ are related by a linear equation (2), which statistical procedure has been developed by Armentrout,^[40] and it can be expressed as:

$$\ln\left(\frac{k}{k_i}\right) = \ln\left[\frac{[\text{A}^-]}{[\text{A}_{\text{ref}(i)}^-]}\right] = \frac{\Delta H^0_{\text{ref}(i)} - \Delta H^0_{\text{acid}}}{RT_{\text{eff}}} - \left[\frac{\Delta H^0_{\text{acid}} - \Delta H^0_{\text{ref}(i)}}{RT_{\text{eff}}} - \frac{\Delta(\Delta S^0)}{R}\right] \quad (2)$$

where, $\Delta H^0_{\text{ref}(i)}$ is the average deprotonation enthalpy of the reference acids $[\text{A}_{\text{ref}(i)}\text{H}]$, T_{eff} is an “effective temperature”^[51,52] related to the excitation energy of the dissociating $[\text{A} \cdot \text{H} \cdot \text{A}_{\text{ref}(i)}]^-$ heterodimers. The entropic term $\Delta(\Delta S^0)$ can be expressed as the difference in the deprotonation entropies of the two acids^[53,54] $\Delta(\Delta S^0) \approx \Delta S^0_{\text{acid}} - \Delta S^0_{\text{ref}(i)}$ or, assuming that the last term is equal to average deprotonation entropy, as $\Delta(\Delta S^0) \approx \Delta S^0_{\text{acid}} - \Delta S^0_{\text{ref}(i)}$. Thus, for a series of experiments using several reference acids, under different collision energies, the set of plots of $\ln(k/k_i)$ versus $(\Delta H^0_{\text{ref}(i)} - \Delta H^0_{\text{acid}})$ follows a linear relationship characterized by a slope equal to $1/RT_{\text{eff}}$ and a y intercept including terms expressed between brackets in Equation (2). Inasmuch as these parameters are not independent, a further plot of them (intercepts versus slopes) yields a second straight line with a slope given by the deprotonation enthalpy difference $(\Delta H^0_{\text{ref}(i)} - \Delta H^0_{\text{acid}})$ and an intercept given by $\Delta(\Delta S^0)/R$. Finally, the gas-phase acidity, ΔG^0_{acid} , of AH is derived from equation, $\Delta G^0_{\text{acid}} = \Delta H^0_{\text{acid}} - T(\Delta S^0_{\text{acid}})$.

Stock solutions (ca. 10^{-3} mol L⁻¹, in methanol) of the amine–borane complex, AH, and reference acid, $\text{A}_{\text{ref}(i)}\text{H}$, were mixed in appropriate volume ratios (ca. 1:1), and further diluted also with methanol to achieve a final concentration of approximately 10^{-4} mol L⁻¹ for both, the amine–borane complex and the reference acid (sample solution). All the sample solutions were directly infused into the ESI source at flow rate of 10 $\mu\text{L min}^{-1}$.

The ESI conditions were optimized to obtain the maximum intensity of the heterodimer $[\text{A} \cdot \text{H} \cdot \text{A}_{\text{ref}(i)}]^-$. Thus, the ESI needle voltage was varied between -2.5 and -5.0 kV, the capillary voltage was kept within the range, -20 to -70 V. Compressed air was used as the nebulizing gas while nitrogen was used as the desolvation gas; the drying gas temperature was set between 100 and 250 °C. CID-MS-MS spectra were obtained after selection of the heterodimer $[\text{A} \cdot \text{H} \cdot \text{A}_{\text{ref}(i)}]^-$ by the first quadrupole (Q1) and activated by collision in the second quadrupole (Q2) using

argon at a nominal pressure of 0.2 mTorr to maintain single collision conditions. The dissociation products were mass analyzed by scanning the third quadrupole (Q3). The CID experiments were performed using 6 to 13 different collision energies, corresponding to the center-of-mass energies (E_{CM}) from 0.75 to 3.0 eV. E_{CM} was calculated using the expression, $E_{\text{CM}} = (\frac{m}{m+M})E_{\text{lab}}$, where E_{lab} is the collision energy in the laboratory frame, m is the mass of argon and M is the mass of proton-bound heterodimer anion $[\text{A}\cdot\text{H}\cdot\text{A}_{\text{ref}(i)}]^-$.

Eighteen compounds with known gas-phase acidities, ΔG^0_{acid} , ranging from 1343.5 to 1463.1 kJ mol⁻¹ were chosen as the reference acids, $\text{A}_{\text{ref}(i)}\text{H}$ ($i=1-18$). The details of the experimental data obtained using the EKM method for each amine–borane complex under investigation are described in the Supporting Information (Tables S1–S22, Figures S1–S36).

Computational details: The rationalization of increased acidity of amine–borane complexes with respect to the free amines requires a reliable analysis of the electronic changes undergone by the amine when it interacts with BH_3 . The first requirement to be sure that the model will be reliable is to have good agreement between the measured and the calculated acidities, because this will be indirect evidence that the structures used in the calculations, for both the neutral and the deprotonated systems, are the same as those being probed experimentally. For this reason we used a high-level ab initio approach, that is, the one based on G4 theory, which has been shown to provide very accurate values for the enthalpies of various reactions.^[55] Considering that these high-level approaches may be prohibitively expensive when investigating very large systems, we have considered it of interest to explore the performance of a model, based on the use of the B3LYP density functional theory approach,^[56,57] which has been shown to perform very well for the calculation of the intrinsic acidities of phosphine–borane complexes.^[14] For this model, the geometries were optimized using a 6-31+G(d,p) expansion and the final energies were obtained in single-point calculations using the aforementioned optimized geometries and a 6-311+G(3df,2p) basis set. All these calculations have been carried out with the Gaussian09 suite of programs.^[58]

Because one of the main parts in the bonding between amines and borane is the dative bond formed upon the transfer of electron density from the lone pair of the nitrogen atom of the amine to the empty 2p orbital of BH_3 , the NBO approach, as implemented using the NBO-5G suite of programs,^[60] is particularly well suited to describe these interactions, and allows also the calculation of the Wiberg bond order.^[59] A complementary description of the bonding in amine–borane complexes can be obtained by means of the atoms in molecules (AIM)^[61] and the electron localization function (ELF) theories.^[64,65] The AIM and ELF calculations were carried out by using the AimAll^[63] and the TopMod^[66] packages, respectively.

Results and Discussion

To determine experimentally the gas-phase acidity of amine–borane complexes, AH, applying the EKM method [Eq. (2)], we selected four reference acids $\text{A}_{\text{ref}(i)}\text{H}$ for each amine–borane complex, based on the stability of the anions for the proton-bound heterodimer $[\text{A}\cdot\text{H}\cdot\text{A}_{\text{ref}(i)}]^-$ and the CID product ions (A^- and $\text{A}_{\text{ref}(i)}^-$). As an example, we present in Figure 1 two thermo-kinetic graphs for benzylamine borane. The first graph (Figure 1a) is a set of the plots of $\ln([\text{A}^-]/[\text{A}_{\text{ref}(i)}^-])$ versus $(\Delta H^0_{\text{ref,acid}(i)} - \Delta H^{\text{av}}_{\text{ref,acids}})$, where $\Delta H^{\text{av}}_{\text{ref,acids}}$ ((1462.2 ± 8.9) kJ mol⁻¹) is the average of deprotonation enthalpies of the reference acids, $\Delta H^0_{\text{ref,acid}(i)}$ ($i=10, 11, 13$, and 14) (see the Supporting Information). The data were fitted by a set of ten regression lines, each one corresponding to experiments done with collision energies, E_{CM} ,

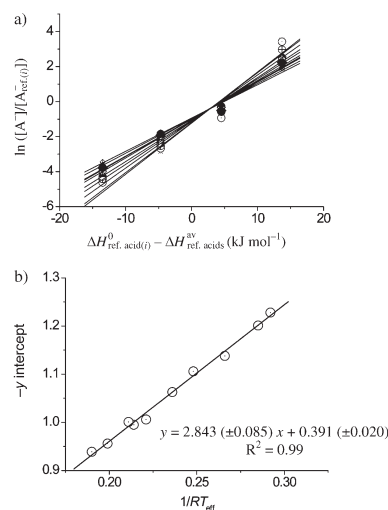


Figure 1. EKM plots for AH=benzylamine borane: a) plots of $\ln(k/k_i)$ versus $(\Delta H^0_{\text{ref,acid}(i)} - \Delta H^{\text{av}}_{\text{ref,acids}})$ from the CID of heterodimer $[\text{A}\cdot\text{H}\cdot\text{A}_{\text{ref}(i)}]^-$ (formed with four reference acids $i=10, 11, 13$, and 14) at ten collision energies E_{CM} (0.75–3.0 eV, intervals of 0.25 eV). b) Plot of y intercept points, $[(\Delta H^0_{\text{acid}} - \Delta H^{\text{av}}_{\text{ref,acids}})/RT_{\text{eff}} - \Delta(\Delta S^0)/R]$, versus slopes $1/RT_{\text{eff}}$.

in the range 0.75–3.0 eV (intervals of 0.25 eV). The second thermo-kinetic plot (Figure 1b) was generated by plotting the y intercept values (related to the expression within the square brackets in Equation (2)) versus the slopes, $1/RT_{\text{eff}}$, which were extracted from the first graph. The gas-phase thermochemical quantities of benzylamine borane were derived from the slope and the negative y intercept values of the linear fit of the second plot: $\Delta H^0_{\text{acid}} = (1465.0 \pm 8.9)$ kJ mol⁻¹, $\Delta S^0_{\text{acid}} = (95.1 \pm 8.4)$ J mol⁻¹ K⁻¹ and $\Delta G^0_{\text{acid}} = (1436.7 \pm 8.9)$ kJ mol⁻¹.

The calculated and measured gas-phase acidities of the amine–borane complexes under investigation are summarized in Table 1.

For the sake of completeness, this table also includes the gas-phase acidities of the free amines. Only for some of the amines considered here are the experimental gas-phase acidities known. Unfortunately, the EKM method used in this work is not well suited to measure the acidity of very weak acids, such as the amines. Nevertheless, it is worth noting that for those cases in which the experimental acidity is known, the agreement with our G4-based calculated values is excellent, and therefore our estimates for the unknown gas-phase acidities should be accurate. This agreement between experimental and calculated values is also excellent for the gas-phase acidities of amine–borane complexes. The agreement is slightly worse when the B3LYP values are used, values that are, in general, slightly lower than the experimental values. Nevertheless, there is a reasonably good linear correlation between the B3LYP/6-311+G(3df,2p) gas-phase acidities and the G4-based calculated values (see

Table 1. Experimental and G4-based calculated gas-phase acidities, ΔG_{acid}^0 [kJ mol⁻¹], for several amines and the corresponding amine–borane complexes; $\Delta\Delta G_{\text{acid}}^0$ [kJ mol⁻¹] is the increase in acidity on going from the free amine to the amine–borane complex.

Amine	Free amine		Amine–borane complex		$\Delta\Delta G_{\text{acid}}^0$ [kJ mol ⁻¹] calcd
	exptl ^[a]	calcd	exptl	calcd ^[b]	
ammonia	1656.8 ± 1.6	1657.2	–	1462.1 (1456.7)	195.1
methylamine	1651 ± 11.0	1656.1	1461.0 ± 9.2	1462.4 (1455.2)	193.7
dimethylamine	1623 ± 8.8	1621.8	1457.9 ± 9.2	1453.7 (1444.4)	168.1
allylamine	–	1616.5	1443.7 ± 8.8	1444.2 (1437.4)	172.3
cyclopropylamine	–	1618.3	1440.5 ± 9.2	1447.3 (1442.1)	171.0
benzylamine	–	1588.9	1436.7 ± 8.9	1438.1 (1435.5)	150.8
aziridine	–	1603.3	1443.4 ± 8.9	1435.5 (1432.2)	167.8
propargylamine	–	1608.8	1435.1 ± 8.9	1431.1 (1425.4)	177.7
trifluoroethylamine	–	1579.4	1405.0 ± 9.4	1400.5 (1393.5)	178.9
aniline	1502 ± 8.4	1506.7	1365.7 ± 9.4	1360.3 (1353.6)	146.4

[a] Values taken from Ref. [67]. [b] Values within parentheses were obtained at the B3LYP/6-311+G(3df,2p)/B3LYP/6-31+G(d,p) level.

the Supporting Information, Figure S37), and therefore in the case where the gas-phase acidities of larger amine–borane complexes needs to be estimated, this theoretical model can be used as a good alternative to G4 theory, which may be prohibitively expensive.

The calculated values given in Table 1 correspond to processes in which the proton is lost from the amino group of the amine–borane complex. The anion so produced is in all cases, except for PhCH₂NH₂·BH₃ and CF₃CH₂NH₂·BH₃, the most stable one. For both PhCH₂NH₂·BH₃ and CF₃CH₂NH₂·BH₃, the most stable anions (see the Supporting Information, Figure S38) correspond to structures in which the proton is lost from borane moiety. The increased stability of these two structures, which can be viewed as the interaction between a NH₂BH₂ group and either the C₆H₅CH₂⁻ or the CF₃CH₂⁻ anions, respectively, just reflects the high stability of both the neutral NH₂BH₂ group and the accompanying anions. Accordingly, these boron-deprotonated structures are predicted to be 22 and 15 kJ mol⁻¹ more stable than the corresponding amine-deprotonated species, respectively. Nevertheless, the good agreement between the calculated and experimental values in Table 1 for these two amine–borane complexes seems to indicate that under the experimental conditions only the amine-deprotonated species is formed. To explain this apparent dichotomy we investigated in detail and compared BH₃ and NH₂ deprotonation by using PhCH₂NH₂·BH₃, as a suitable example. As illustrated in Figure 2, the most stable anion (structure **C**) is the result of the dissociation of the borane-deprotonated species **B**, which involves a barrier (transition state, **TSBC**) of 100 kJ mol⁻¹. However, direct deprotonation of the BH₃ group of PhCH₂NH₂·BH₃ to yield structure **B** is much less favorable (by 300 kJ mol⁻¹) than the direct deprotonation of the amino group to yield anion **A**; this was found to be the case for all other amine–borane complexes investigated herein. It is also worth noting that the transfer of a proton from the BH₃ group in anion **A** to the N atom, is accompa-

nied by cleavage of the C–N bond. The consequence is that the transition state associated with this proton transfer, namely **TSAC**, directly connects anions **A** and **C**, through a barrier of 228 kJ mol⁻¹. Hence, in spite of its increased stability, form **C** can only be reached through a very energetically demanding processes, from either structures **A** or **B**.

In addition, an examination of the molecular electrostatic potential of both benzylamine and CF₃CH₂NH₂ shows that for both molecules the positive potential areas (blue) are those close to the amino group (Figure 3). This means that the association of the molecule with the reference anion takes place at the amino group and never at the BH₃ group; the interaction of the latter with the attacking anion would be highly repulsive because of the hydride character of the BH₃ hydrogen atoms. These data are consistent with the much less favorable deprotonation of the BH₃ group. Hence, under

normal experimental conditions, the deprotonation of the amino group will be always favored and, as indicated above,

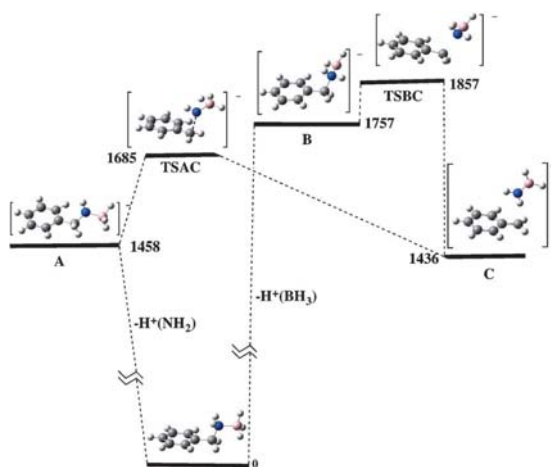


Figure 2. Energy profile of the NH₂ and BH₃ deprotonation processes of benzylamine·BH₃. All values are in kJ mol⁻¹.

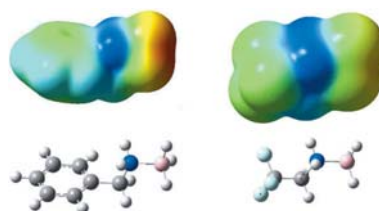
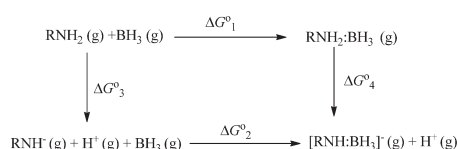


Figure 3. Molecular electrostatic potential of PhCH₂NH₂·BH₃ (left) and CF₃CH₂NH₂·BH₃ (right). Blue areas correspond to positive values of the potential, whereas red areas correspond to negative values of the potential.

its conversion into the more stable structure **C** would not take place because the transformation would involve a very high activation barrier.

Notably, there is a large increase in acidity on going from the free amine to the corresponding amine–borane complex (Table 1). Furthermore, these increases in acidity depend on the nature of the group attached to the nitrogen atom. It can be observed, for instance, that whereas the deprotonation of ammonia and methylamine borane leads to similar levels of stabilization, the deprotonation of dimethylamine borane leads to about 25 kJ mol^{-1} less stabilization. Also, smaller increases in acidity are observed for aniline and benzylamine. The origin of the increased acidity can be understood by means of the thermodynamic cycle presented in Scheme 2. In this scheme, the values of ΔG_1^0 and ΔG_2^0 rep-



Scheme 2. Thermodynamic cycle involving amines, deprotonated amines, and the corresponding borane complexes.

resent the stabilization upon borane-complex formation of the free amine and its conjugate base, respectively. Accordingly, ΔG_3^0 and ΔG_4^0 are the gas-phase acidities of the free amine and the corresponding amine–borane complex, respectively. Hence, this implies that if the absolute value of ΔG_4^0 is greater than that of ΔG_3^0 by a certain amount, then the absolute value of ΔG_2^0 would be greater than that of ΔG_1^0 by the same amount. Therefore, the stabilization of the deprotonated species by association to BH_3 is larger than that of the corresponding neutral free amine, as corroborated by the G4-based calculated values (see Table 2), which shows that the stabilization of the deprotonated species is 216 kJ mol^{-1} on average whereas for the neutral species this stabilization is only 88 kJ mol^{-1} on average.

The data in Table 2 can be easily rationalized by taking into account that deprotonated amines are much better elec-

tron donors than their neutral counterparts. The loss of a proton leads to a significant increase in the energy of the HOMO of the system and a parallel increase of its electron-donor capacity. This is also reflected in the characteristics of the bond formed between the nitrogen atom and the boron atom (see the Supporting Information, Table S23). The donation of lone pair of the nitrogen atom into the empty 2p orbital of the boron atom, leads to a strongly polar chemical bond in which the contribution (82%) of the nitrogen-based hybrid orbitals to the bond is dominant. For the deprotonated species, the contribution of the boron-based hybrid orbitals to the bond is significantly higher (from 18% to 24%), whereas a concomitant increase of the s character of the hybrid orbitals participating in the bond is also observed. Consequently, the bond between the boron atom and the nitrogen atom of the deprotonated amine is stronger and this is reflected in both the value of the Wiberg bond index and the value of the electron density, ρ_b , at the corresponding bond critical point (see the Supporting Information, Table S23).

The ELF plots (Figure 4) are consistent with the previous analysis and they show how the lone pair that is created upon the deprotonation of the amino groups connects (par-

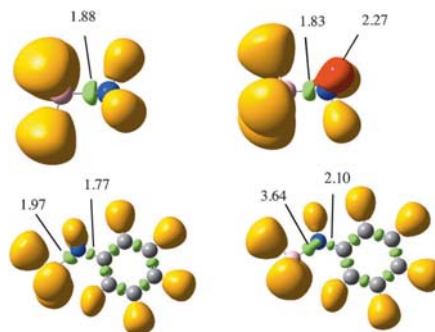


Figure 4. ELF (0.80) for the $\text{NH}_3\cdot\text{BH}_3$ and $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2\cdot\text{BH}_3$ complexes and their corresponding nitrogen-deprotonated species. Green lobes denote disynaptic basins involving two heavy atoms. Orange lobes are disynaptic basins in which H is one of the atoms involved. Red lobes correspond to lone pairs. The populations shown are e^- .

Table 2. Stabilization free energy of neutral (ΔG_1^0) and deprotonated (ΔG_2^0) amines upon BH_3 association.

Amine	ΔG_1^0	ΔG_2^0
ammonia	−77.9	−273.1
methylamine	−96.3	−290.1
dimethylamine	−107.8	−276.0
allylamine	−95.0	−209.1
cyclopropylamine	−71.2	−251.3
benzylamine	−112.4	−263.2
aziridine	−97.7	−265.5
propargylamine	−90.2	−267.9
trifluoroethylamine	−78.5	−257.3
aniline	−57.7	−209.1

tially delocalizes) with the disynaptic B–N basin. This effect becomes more apparent in the case of aniline, where the new nitrogen lone pair and the B–N disynaptic basin appear as a unique basin of population 3.64 electrons.

The reason why the increase in acidity is much smaller for aniline than for other amines in the series is related to the aromatic character of the system. As shown in Table 2, the free aniline is a poorer electron donor than the other amines as reflected in the lower ΔG_1^0 value, because the lone pair on the nitrogen atom conjugates with the aromatic system. This is consistent with the fact that NBO analysis (see the Supporting Information, Table S23) does not locate

a B–N bond (with the default indexes of the NBO 5.0 program) but instead locates a dative bond between the lone pair of the nitrogen atom and the empty p orbital on the boron atom. The conjugation of one of the lone pairs with the aromatic system is increased in the case of the deprotonated amine, thus leading to a shortening by 0.13 Å of the C–N bond, as well as a significant increase of both the electron density at the corresponding bond critical point (see the Supporting Information, Table S23) and the electron population of the C–N disynaptic basin (Figure 4). Still, the N–B bond is 0.09 Å shorter in the deprotonated amine because it is a better donor toward the boron atom than the neutral amine, through the second lone-pair. However, the donor capacity of the second lone pair is smaller because the aforementioned conjugation necessarily decreases the intrinsic basicity of the amino group.

The origin of the differences between methylamine and dimethylamine is more subtle. As shown in Table 2 the value of ΔG^0_1 is larger for dimethylamine than methylamine as expected from the increase in the number of methyl substituents. However, the ΔG^0_2 values show the reverse order. The fact that the anion of dimethylamine apparently behaves as a weaker electron donor than the anion of methylamine is an unexpected result. This result likely reflects the higher ability of the $(\text{CH}_3)_2\text{N}^-$ with respect to CH_3HN^- to disperse the excess negative charge, thus leading to the former having a higher relative stability. These differences are not observed, however, for the corresponding $[(\text{CH}_3)_2\text{N}\cdot\text{BH}_3]^-$ and $[\text{CH}_3\text{HN}\cdot\text{BH}_3]^-$ complexes where the negative charge is dispersed among the nitrogen atom and the BH_3 moiety. The participation of the BH_3 moiety in the dispersion of the negative charge of the deprotonated form of the amine–borane complex is one of the factors that contributes to the increase in acidity of these compounds.^[11]

Notably, the increase in acidity that occurs upon coordination of the amines to BH_3 is very large; aniline borane has practically the same gas-phase acidity as phosphoric acid $((1351 \pm 21) \text{ kJ mol}^{-1})$ ^[67] and most of the amine–borane complexes studied herein have gas-phase acidities similar to typical carboxylic acids, such as formic, ethanoic, and propionic acid.^[67]

The increase in acidity measured and calculated herein for amine–borane complexes is significantly larger than that measured and calculated for the phosphine–borane analogues.^[11] For instance, whereas the increase in acidity observed for phenylphosphine and methylphosphine upon BH_3 association is 82 and 118 kJ mol^{-1} , respectively, the increase in acidities for the amine–borane analogues are almost twice these values, being 146 and 194 kJ mol^{-1} , respectively. This observation points to the interaction between the empty p orbital of the boron atom and the lone pair of the nitrogen atom being stronger than that involving the lone pair of a phosphorus atom; this difference is presumably due to the large difference in the size of the orbitals participating in the interaction in the latter case.

Conclusion

From our combined experimental and theoretical survey we conclude that the complexation of different amines with BH_3 leads to new compounds (amine–borane complexes), which exhibit a much larger (from 146 to 195 kJ mol^{-1}) gas-phase acidity. In terms of ionization constants this increment would be about 15 (or more) orders of magnitude. The unexpected consequence is that typical nitrogen bases such as aniline, lead to amine–borane complexes, which, in the gas-phase, are as strong an acid as either phosphoric, oxalic, or salicylic acid, and stronger than many carboxylic acids, such as formic, acetic, and propanoic acid. This increase in acidity is almost twice as large as that observed for the corresponding phosphine–borane analogues. The agreement between the experimental and the G4-based calculated values is excellent. The analysis of the electron density rearrangements of the amine and the borane moieties indicates that the dative bond is significantly stronger in the complex formed from the deprotonated amine than in the corresponding neutral amine–borane complex, because the deprotonated amine is a much better electron donor than the neutral amine. Furthermore, the newly created lone pair on the nitrogen atom of the deprotonated amine, conjugates with the B–N bonding pair, thus stabilizing the anion. The contribution of BH_3 to the dispersion of the excess electron density of the anion is another factor contributing to the increased stability of the anions and therefore to the increased acidity of the amine–borane complexes with respect to the isolated amines.

Acknowledgements

This work was partially supported by the DGI (Projects No. CTQ2009-13129-C01, CTQ2009-07197-E), by the Project MADRISOLAR2, Ref.: S2009PPQ/I533 of the Comunidad Autónoma de Madrid, by Consolider on Molecular Nanoscience CSC2007-00010, and by the COST Action CM0702. We also gratefully acknowledge the support of Spanish MICINN Projects: CTQ 2009-13652 and “Acciones Integradas 2009” (Ref. FR2009-0068): -PHC PICASSO 22973TL. A generous allocation of computing time at the CCC of the UAM is also acknowledged. Helpful discussions with Prof. O. Mó are greatly acknowledged.

- [1] G. C. Pimentel, A. L. McClelland, *The Hydrogen Bond*, W. H. Freeman and Co., San Francisco, **1960**.
- [2] P. A. Kollman, L. C. Allen, *Chem. Rev.* **1972**, 72, 283–303.
- [3] S. J. Grabowski, *Hydrogen Bonding: New Insights*, Springer, Heidelberg, **2006**.
- [4] P. Metrangola, G. Resnati, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 2511–2519.
- [5] P. Politzer, P. Lane, M. C. Concha, Y. G. Ma, J. S. Murray, *J. Mol. Model.* **2007**, 13, 305–311.
- [6] M. Palusiak, S. J. Grabowski, *Struct. Chem.* **2008**, 19, 5–11.
- [7] P. Politzer, J. S. Murray, T. Clark, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 7748–7757.
- [8] M. Yáñez, P. Sanz, O. Mó, I. Alkorta, J. Elguero, *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, 5, 2763–2771.
- [9] Q. Z. Li, X. F. Liu, R. Li, J. B. Cheng, W. Z. Li, *Spectrochim. Acta Part A* **2012**, 90, 135–140.
- [10] T. Brinck, J. S. Murray, P. Politzer, *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 2622–2625.

- [11] J. H. Ren, D. B. Workman, R. R. Squires, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10511–10522.
- [12] S. Fau, G. Frenking, *Mol. Phys.* **1999**, *96*, 519–527.
- [13] F. Bessac, G. Frenking, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 7990–7994.
- [14] M. Hurtado, M. Yáñez, R. Herrero, A. Guerrero, J. Z. Dávalos, J.-L. M. Abboud, B. Khater, J. C. Guillemin, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4622–4629.
- [15] B. Németh, B. Khater, T. Veszpremi, J. C. Guillemin, *Dalton Trans.* **2009**, 3526–3535.
- [16] I. Alkorta, J. Elguero, J. E. Del Bene, O. Mó, M. Yáñez, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11897–11905.
- [17] A. Martín-Sómer, A. M. Lamsabhi, O. Mó, M. Yáñez, *Comput. Theor. Chem.* **2012**, DOI:10.1016/j.comptc.201206009.
- [18] K. Müller, K. Stark, B. Müller, W. Arlt, *Energy Fuels* **2012**, *26*, 3691–3696.
- [19] J. L. Abboud, B. Németh, J. C. Guillemin, P. Burk, A. Adamson, E. R. Nerut, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 3981–3991.
- [20] C. A. Jaska, K. Temple, A. J. Lough, I. Manners, *Chem. Commun.* **2001**, 962–963.
- [21] B. L. Dietrich, K. I. Goldberg, D. M. Heinekey, T. Autrey, J. C. Linehan, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 8583–8585.
- [22] T. M. Douglas, A. B. Chaplin, A. S. Weller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14432–14433.
- [23] L. J. Sewell, A. B. Chaplin, A. S. Weller, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7499–7501.
- [24] A. J. M. Miller, J. E. Bercaw, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1709–1711.
- [25] R. E. Lyle, E. W. Southwic, *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 2201–2202.
- [26] B. S. Burnham, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1995–2010.
- [27] R. O. Hutchins, K. Learn, B. Nazer, D. Pytlewski, A. Pelter, *Org. Prep. Proced. Int.* **1984**, *16*, 335.
- [28] A. E. Leontjev, L. L. Vasiljeva, K. K. Pivnitsky, *Russ. Chem. Bull.* **2004**, *53*, 703–708.
- [29] M. A. Funke, H. Mayr, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1214–1222.
- [30] J. C. Cabacungan, A. I. Ahmed, R. E. Feeney, *Anal. Biochem.* **1982**, *124*, 272–278.
- [31] M. Lelental, *J. Catal.* **1974**, *32*, 429–433.
- [32] S. B. Kalidindi, U. Sanyal, B. R. Jagirdar, *ChemSusChem* **2011**, *4*, 317–324.
- [33] R. E. McCoy, S. H. Bauer, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2061–2065.
- [34] B. P. Robinson, K. A. H. Adams, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 6169–6171.
- [35] F. M. Tayler, GB 909390 19621031 Patent, CAS 58:40084.
- [36] K. M. Johnson, J. N. Kirwan, B. P. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 1125–1132.
- [37] C. J. Foret, M. A. Chiusano, J. D. O'Brien, R. D. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1980**, *42*, 165–169.
- [38] X. H. Cheng, Z. C. Wu, C. Fenselau, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4844–4848.
- [39] B. A. Cerda, C. Wesdemiotis, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11884–11892.
- [40] P. B. Armentrout, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 371–379.
- [41] X. B. Zheng, R. G. Cooks, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 9939–9946.
- [42] K. M. Ervin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 435–452.
- [43] L. Drahos, K. Vekey, *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 1025–1042.
- [44] K. M. Ervin, P. B. Armentrout, *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1004–1015.
- [45] L. Drahos, C. Peltz, K. Vekey, *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1016–1024.
- [46] G. Bouchoux, *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 775–835.
- [47] R. G. Cooks, T. L. Kruger, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1279–1281.
- [48] R. G. Cooks, J. S. Patrick, T. Kotiaho, S. A. McLuckey, *Mass Spectrom. Rev.* **1994**, *13*, 287–339.
- [49] R. G. Cooks, P. S. H. Wong, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 379–386.
- [50] R. G. Cooks, J. T. Koskinen, P. D. Thomas, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 85–92.
- [51] K. M. Ervin, *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *195*, 271–284.
- [52] L. Drahos, K. Vekey, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 79–84.
- [53] J. H. Ren, J. P. Tan, R. T. Harper, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 10903–10912.
- [54] S. Mukherjee, J. H. Ren, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 1720–1729.
- [55] L. A. Curtiss, P. C. Redfern, K. Raghavachari, *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 084108.
- [56] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1372–1377.
- [57] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
- [58] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, Gaussian09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- [59] K. B. Wiberg, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 1083–1088.
- [60] E. D. Glendening, J. Badenhoop, K. A. E. Reed, J. E. Carpenter, J. A. Bohmann, J. A. Morales, F. Weinhold, *NBO 5G Program*, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, WI, **2001**.
- [61] R. F. W. Bader, *Atoms in Molecules. A Quantum Theory*, Clarendon Press, Oxford **1990**.
- [62] D. Cremer, E. Kraka, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 612–614; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 627–628.
- [63] AIMAll (Version 11.12.19), ed. T. A. Keith, TK Gristmill Software, Overland Park KS, USA, **2011**.
- [64] A. D. Becke, K. E. Edgecombe, *J. Chem. Phys.* **1990**, *92*, 5397–5403.
- [65] B. Silvi, A. Savin, *Nature* **1994**, *371*, 683–686.
- [66] S. Noury, X. Krokidis, F. Fuster, B. Silvi, *Comput. Chem. Eng.* **1999**, *23*, 597–604.
- [67] NIST Chemistry Webbook. Standard Reference Database Number 69. Eds. P. J. Linstrom and W. G. Mallard, Release June 2005, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899 (<http://webbook.nist.gov>). **2012**.

Received: June 20, 2012
Published online: October 11, 2012

A silver complex of chloroquine: synthesis, characterization and structural properties†

Cite this: *New J. Chem.*, 2013, **37**, 1391

Juan Z. Dávalos,^{*a} Javier González,^a Andrés Guerrero,^a Ana C. Valderrama-Negrón,^b Larry D. Aguirre Méndez,^b Rosa M. Claramunt,^c Dolores Santa María,^c Ibon Alkorta^d and José Elguero^d

A new silver–chloroquine (**CQ**–Ag) complex [**CQ**AgNO₃, **CQ** = chloroquine, C₁₈H₂₆N₃Cl] has been synthesized and characterized by using a combination of NMR (solution and solid-state), FTIR, molar conductivity and ESI/FT-ICR high resolution mass spectroscopy with DFT calculations. The **CQ**–Ag complex is formed by silver–**CQ** cations and nitrate counter anions, where the silver atoms are di-coordinated to chloroquines (**CQ**₂Ag²⁺) through the quinoline sp² N and diethylamino sp³ N nitrogen basic sites. These cations presumably form polymeric structures mainly as head–head catemers. The most important cationic fragments of the **CQ**–Ag complex, detected by ESI/FT-ICR, were **CQ**Ag⁺, **CQ**₂Ag⁺, chloroquine singly (**CQH**⁺) and doubly protonated (**CQH**₂²⁺), whose formations are clearly favored by proton-displacement of the Ag⁺ cations.

Received (in Gainesville, FL, USA)
11th October 2012,
Accepted 7th February 2013

DOI: 10.1039/c3nj40921j

www.rsc.org/njc

1 Introduction

The progress in the treatment of any illness results not only from the discovery of new drugs but also from the improvement of the existing ones. Anti-malarial drugs have a long history from quinine to doxycycline with chloroquine (**CQ**) as the most widely used. Discovered in the Bayer laboratories in 1934 it was only during the World War II that its use became prevalent. Although nearly 80 years old, the interest in **CQ** continues unabated.^{1–3} **CQ** is usually sold and used as diphosphate (the free base is much less frequent)⁴ and correspond to the racemic form. Whether one of the enantiomers is more potent or less harmful than the other is still a subject of controversy.^{5,6}

One of the possibilities to modify a drug with the aim to improve some of its properties is to bind it to a metal ion, for instance, Ag(I), Co(II) and Cu(II).^{7–9} In the case of **CQ**, the union could be indirect, as in ferroquine [where the NH–CH(CH₃)(CH₂)₃NEt₂ chain was replaced by a NH–CH₂–(ferrocenyl)–CH₂NMe₂ chain],^{10,11} or direct, much closer to the present study. **CQ** complexes with Ru,

Ir and Rh have been prepared and evaluated as anti-malarial.^{12–14} Subsequently the Au(I) and Au(III) complexes of **CQ** were synthesized and evaluated.^{15–17}

The present paper reports our structural studies on the chloroquine–silver complex (**CQ**–Ag). The compounds under study are reported in Scheme 1. Note that all the present work has been carried out with racemic chloroquine.

Since the silver salt of chloroquine (**CQ**) does not yield crystals good enough for X-ray diffraction we have had recourse to solid state NMR to establish its structure in the solid state. The structure of **CQ** [CDMQUI], those of several dications of **CQH**₂²⁺ [CLQUON01, GEXXAI and HOJLOI], as well as the dinitrate of **CQ**Au²⁺ (SUXXEP) have been found in the CSD (Scheme 2).¹⁸ This last structure is particularly relevant for the ensuing discussion.¹⁹

Besides, the structure of some complexes that deserve to be reported here has been proposed without crystallographic proof (Scheme 3).^{12,13}

2 Experimental

2.1 Materials

All reagents and solvents were reagent grade and used without further purification: silver nitrate (Merck Chemicals), chloroquine diphosphate (Sigma) and solvents (Tedia). Free chloroquine base (**CQ**) was obtained from chloroquine diphosphate (**CQ**·2H₃PO₄) following the method described by Sánchez-Delgado and colleagues²⁰ and its purity was checked by elemental analysis (C₁₈H₂₆N₃Cl; calc: C, 67.69; H, 8.19;

^a Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC. C/Serrano, 119, E-28006 Madrid, Spain. E-mail: jdavalos@iqfr.csic.es; Fax: +34 91 564247; Tel: +34 91 5619400

^b Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av Túpac Amaru 210, PE-LIMA 025, Lima, Perú. E-mail: laguirrem@uni.pe

^c Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica, Facultad de Ciencias, UNED, Senda del Rey 9, E-28040 Madrid, Spain. E-mail: dsanta@ccia.uned.es

^d Instituto de Química Médica, CSIC, C/Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid, Spain. E-mail: ibon@iqm.csic.es; Fax: +34 91 5644853

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3nj40921j

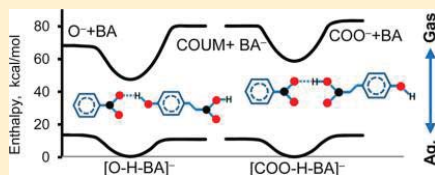
Gas Phase Acidity Measurement of Local Acidic Groups in Multifunctional Species: Controlling the Binding Sites in Hydroxycinnamic Acids

Andres Guerrero,^{*,†} Tomas Baer,[‡] Antonio Chana, Javier González, and Juan Z. Dávalos^{*}

Instituto de Química Física "Rocasolano", CSIC, C Serrano 119, Madrid, E-28006, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: The applicability of the extended kinetic method (EKM) to determine the gas phase acidities (GA) of different deprotonable groups within the same molecule was tested by measuring the acidities of cinnamic, coumaric, and caffeic acids. These molecules differ not only in the number of acidic groups but in their nature, intramolecular distances, and calculated GAs. In order to determine independently the GA of groups within the same molecule using the EKM, it is necessary to selectively prepare pure forms of the hydrogen-bonded heterodimer. In this work, the selectivity was achieved by the use of solvents of different vapor pressure (water and acetonitrile), as well as by variation of the drying temperature in the ESI source, which affected the production of heterodimers with different solvation energies and gas-phase dissociation energies. A particularly surprising finding is that the calculated solvation enthalpies of water and the aprotic acetonitrile are essentially identical, and that the different gas-phase products generated are apparently the result of their different vapor pressures, which affects the drying mechanism. This approach for the selective preparation of heterodimers, which is based on the energetics, appears to be quite general and should prove useful for other studies that require the selective production of heterodimers in ESI sources. The experimental results were supported by density functional theory (DFT) calculations of both gas-phase and solvated species. The experimental thermochemical parameters (deprotonation ΔG , ΔH , and ΔS) are in good agreement with the calculated values for the monofunctional cinnamic acid, as well as the multifunctional coumaric and caffeic acids. The measured GA for cinnamic acid is 334.5 ± 2.0 kcal/mol. The measured acidities for the COOH and OH groups of coumaric and caffeic acids are 332.7 ± 2.0 , 318.7 ± 2.1 , 332.2 ± 2.0 , and 317.3 ± 2.2 kcal/mol, respectively.



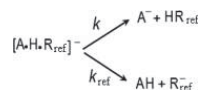
INTRODUCTION

The developments of electrospray ionization (ESI) and matrix assisted laser desorption ionization (MALDI), which generate ions directly from condensed phase samples, have revolutionized mass spectrometry by overcoming one of its main limitations: the dependence on the volatility of the samples. As a result, important thermally labile biological species such as amino acids and peptides can now be routinely investigated by mass spectrometry. On the other hand, the usual methodologies established for the study of thermochemical properties by mass spectrometry use ion–molecule reactions for which the presence of neutral species is necessary. Among these are the equilibrium method,^{1–10} the kinetic bracketing technique,^{11–18} and the Bouchoux thermokinetic approach,^{19–21} all of which require volatile neutral reaction partners.

The kinetic method (KM) developed by Cooks et al. in 1977^{22,23} greatly expanded the range of systems that can be investigated by eliminating the need for a neutral reaction partner. Moreover, the KM is conceptually simple, easy to use, reproducible, not affected by the presence of contaminants, and can be applied to determine various thermochemical properties such as gas-phase basicities (GBs), gas-phase acidities (GAs), or metal salt affinities. Finally, it does not depend on knowing the pressure inside of the instrument. Briefly, the KM is based on

the rates of competitive dissociation of mass-selected cluster ions formed between a sample and a reference of known thermochemical properties. For instance, if the GA of the AH molecule is of interest, one can generate a hydrogen bridged cluster anion between it and a reference acid, $R_{ref}H$, whose GA is known (see Scheme 1).

Scheme 1



Under appropriate conditions, these rates can yield quantitative thermochemical information relative to the reference. During the last 30 years, the method has been revised and improved by the contribution of many groups including Fenselau,^{24,25} Wesdemiotis,^{26–28} Armentrout,^{29–31} and Ervin.³² As a result, the KM has become one of the most frequently used experimental approaches for measuring

Received: January 17, 2013

Published: May 15, 2013



BINOL

Static and Dynamic Properties of 1,1'-Bi-2-naphthol and Its Conjugated Acids and Bases

Ibon Alkorta,^{*,[a]} Céline Cancedda,^[b] Emilio José Cocinero,^{*,[c]} Juan Z. Dávalos,^{*,[d]} Patrica Écija,^[c] José Elguero,^[a] Javier González,^[d] Alberto Lesarri,^[e] Rocio Ramos,^[d] Felipe Reviriego,^[a] Christian Roussel,^[b] Iciar Uriarte,^[c] and Nicolas Vanthuyne^{*,[b]}

Abstract: Several convergent techniques were used to characterize 1,1'-bi-2-naphthol (BINOL) and some of its properties. Its acidity in the gas-phase, from neutral species to monoanion, was measured by mass spectrometry. The conformation and structure of BINOL in the gas phase was determined by microwave rotational spectroscopy. NMR experiments in fluorosulfonic acid established that BINOL was mo-

noprotonated on one of the hydroxyl oxygen atoms. The enantiomerization barriers reported in the literature for BINOL under neutral, basic, and acid conditions were analyzed with regard to the species involved. Finally, DFT calculations allowed all of these results to be gathered in a coherent picture of the BINOL structure.

1. Introduction

1,1'-Bi-2-naphthol (BINOL) and its derivatives are one of the most widely used classes of ligands in asymmetric synthesis; they are utilized in a broad array of reactions, including Diels–Alder, carbonyl additions and reduction, Michael additions, epoxidations, and Henry reactions. BINOL has axial chirality and the two enantiomers can be separated because they are stable toward racemization. Their specific rotations are $\pm 35.5^\circ$. Besides the great success obtained with the BINOL platform, other C_2 -symmetric diol ligands have attracted considerable at-

tention, for instance, BINAP, VAPOL, VANOL, and related compounds.^[1]

The optical rotatory properties of (*R* or *S*) BINOL in various solvents have been reported.^[2] The changes in the specific rotation and sign of optically active BINOL have been studied in polar/nonpolar solvents at different pH values. It is considered that these changes are determined by the equilibrium between *cisoid* and *transoid* conformations of BINOL with the same configuration (*R* or *S*), which is related to the change in dihedral angle between the two naphthalene ring planes of BINOL (Figure 1). This involves the orthogonal transition state, which is not relevant to the present work.

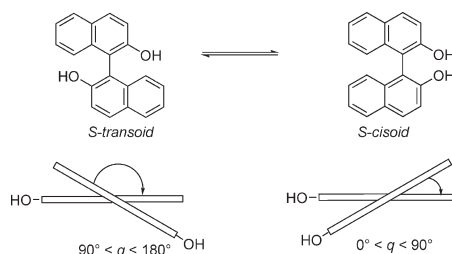


Figure 1. *Cisoid* and *transoid* conformations of BINOL.

The racemic and both pure enantiomers of BINOL are commercially available. The MS and microwave (MW) experiments were carried out with (\pm)-BINOL, and the dynamic experiments to determine the enantiomerization barriers with (*R*)-BINOL.

[a] Prof. I. Alkorta, Prof. J. Elguero, Dr. F. Reviriego
Instituto de Química Médica, CSIC
Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid (Spain)
Fax: (+34) 91-5644853
E-mail: ibon@iqm.csic.es

[b] C. Cancedda, Prof. C. Roussel, Dr. N. Vanthuyne
Aix-Marseille Université, Centrale Marseille
CNRS, iSm2 UMR 7313, 13397 Marseille (France)
E-mail: nicolas.vanthuyne@univ-amu.fr

[c] Dr. E. J. Cocinero, Dr. P. Écija, I. Uriarte
Departamento de Química Física, Facultad de Ciencia y Tecnología
Universidad del País Vasco (UPV-EHU)
Apartado 644, 48080 Bilbao (Spain)
Fax: (+34) 94-4608500
E-mail: emiliojose.cocinero@ehu.es

[d] Prof. J. Z. Dávalos, J. González, R. Ramos
Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC. C/Serrano
119. 28006 Madrid (Spain)
Fax: (+34) 91-5642431
E-mail: jdavalos@iqfr.csic.es

[e] Prof. A. Lesarri
Departamento de Química Física y Química Inorgánica
Facultad de Ciencias
Universidad de Valladolid, 47011 Valladolid (Spain)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201402686>.

Acidities of *closo*-1-COOH-1,7-C₂B₁₀H₁₁ and Amino Acids Based on Icosahedral Carboranes

Juan Z. Dávalos,^{*,†} Javier González,[†] Rocío Ramos,[†] Drahomír Hnyk,^{*,‡} Josef Holub,[‡] J. Arturo Santaballa,[§] Moisés Canle-L.,[§] and Josep M. Oliva^{*,†}

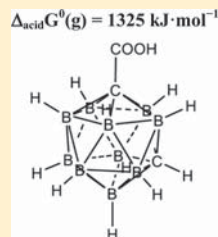
[†]Instituto de Química-Física "Rocasolano", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano 119, ES-28006 Madrid, Spain

[‡]Institute of Inorganic Chemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., 250 68 Husinec-Řež, Czech Republic

[§]Grupo de Reactividade Química e Fotorreatividade, Departamento de Química Física e Enxeñaría Química, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, ES-15071 A Coruña, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Carborane clusters are not found in Nature and are exclusively man-made. In this work we study, both experimentally and computationally, the gas-phase acidity (measured $G_A = 1325 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, computed $G_A = 1321 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) and liquid-phase acidity (measured $pK_a = 2.00$, computed $pK_a = 1.88$) of the carborane acid *closo*-1-COOH-1,7-C₂B₁₀H₁₁. The experimental gas-phase acidity was determined with electrospray tandem mass spectrometry (ESI/MS), by using the extended Cooks kinetic method (EKM). Given the similar spatial requirements of the title icosahedral cage and benzene and the known importance of aminoacids as a whole, such a study is extended, within an acid–base context, to corresponding *ortho*, *meta*, and *para* amino acids derived from icosahedral carborane cages, 1-COOH-*n*-NH₂-1, *n*-R with {R = C₂B₁₀H₁₀, *n* = 2, 7, 12}, and from benzene {R = C₆H₄, *n* = 2, 3, 4}. A remarkable difference is found between the proportion of neutral versus zwitterion structures in water for glycine and the carborane derived amino acids.



1. INTRODUCTION

Since the first years of disclosure (in the 1950s) of the USA and former USSR research on polyhedral boranes for combustion agents in rockets, an enormous amount of literature on the synthesis of heteroborane clusters, and specially *carboranes* or simply *carboranes*,¹ has so far emerged. More recently, interest has increased in the role of carborane derivatives as pharmacophores² and inhibitors in biochemical processes.³ The synthesis of so-called third-generation boron compounds⁴ has led to wide interest toward understanding the role of boron cluster compounds in biology, although boron is not an essential element for living organisms.⁵

In the past few years we have been interested in the reaction mechanisms of ground and excited state chemistry in heteroborane compounds^{6–9} and have recently started a research line that encompasses both experiments (see below) and quantum-chemical computations to study the acidities of heteroborane clusters,¹⁰ which might be relevant in biochemical processes. The fact that the electronegativity of boron toward hydrogen is inverted with respect to carbon raises a question on the influence of carborane-derivative compounds in biological environments.

The most stable boron hydride is the icosahedral dianion *closo*-B₁₂H₁₂^{2–},¹¹ which by formal substitution of two (BH)^{2–} vertices with two (CH)[–] vertices provides the well-known, stable and neutral icosahedral carboranes *closo*-1,2-C₂B₁₀H₁₂, *closo*-1,7-C₂B₁₀H₁₂, and *closo*-1,12-C₂B₁₀H₁₂, simply known as *ortho*-carborane, *meta*-carborane, and *para*-carborane, respec-

tively. Their chemistries have been so far explored,¹ and that of *m*-carborane has been explored to a lesser extent.

In this work we report on experiments and quantum-chemical computations carried out on *closo*-1-COOH-1,7-C₂B₁₀H₁₁ (**1**) and the prediction of physicochemical properties, by means of quantum-chemical computations, of a series of amino acids derived from all the icosahedral carborane based amino carboxylic acids, viz. *closo*-1-COOH-*n*-NH₂-1, *n*-C₂B₁₀H₁₀ (*n* = 2, 7, 12), labeled as (**2a**), (**2b**), and (**2c**) respectively. Because the icosahedral C₂B₁₀ cage and benzene exhibit some similar structural patterns (e.g., their body diagonals are quite comparable, ~2.8 Å versus ~3.2 Å) and share the property of aromaticity,¹² we have extended this study on the corresponding amino derivatives of benzoic acid C₆H₅COOH (**3**), 1-COOH-*n*-NH₂-1, *n*-C₆H₄ (*n* = 2, 3, 4), the three latter labeled as (**3a**), (**3b**), and (**3c**), respectively. Figure 1 depicts and summarizes the structures of the molecules included in this work.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Materials and Instrumentation. Carborane acid **1** was prepared according to the literature procedure.¹³ The reference acids were obtained from Sigma-Aldrich and Alfa-Aesar and used without further purification.

Received: December 18, 2013

Revised: March 21, 2014

Published: March 24, 2014



Intrinsic (gas-phase) acidity and basicity of paracetamol

Juan Z. Dávalos,^{a*} Javier González,^a Rocío Ramos,^a Andrés Guerrero,^a
and Alexandre F. Lago^b

^a *Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC. c/Serrano, 119.E-28006 Madrid, Spain.*

^b *Centro de Ciencias Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, 09210-170 Santo*

André, SP, Brazil

E-mail: jdavalos@iqfr.csic.es

Dedicated to Professor Rosa Maria Claramunt on the occasion of her 65th birthday

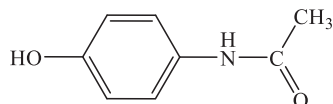
Abstract

Gas phase protonation enthalpy (proton affinity) and deprotonation enthalpy of paracetamol, $PA = 909.4 \pm 8.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $\Delta_{\text{acid}}H^0 = 1430.3 \pm 8.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, have been experimentally determined by the extended kinetic method (EKM) using ESI-triple-quadrupole mass spectrometry. Gas phase basicity and acidity deduced from these experiments, $GB = 869.9 \pm 8.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $GA = 1404.7 \pm 8.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ are in good agreement with calculations performed at the B3LYP level of theory with 6-311++G(3df,2p) and 6-311++G(d,p) basis sets. We also have derived the enthalpy of formation of deprotonated ($\Delta_f H^0(\text{g}) = -386.4 \pm 9.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) and protonated ($\Delta_f H^0(\text{g}) = 346.3 \pm 8.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) paracetamol ions.

Keywords: Paracetamol, acidity, basicity, ESI-MS, Extended Kinetic Method, DFT

Introduction

Paracetamol (acetaminophen, *p*-acetamidophenol, N-(4-hydroxyphenyl) acetamide, $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$, (Structure 1) is probably the most versatile chemical compound and used worldwide in drug formulations of analgesic, anti-inflammatory and antipyretic. The polymorphic forms, in solid state, of this compound have been widely studied.¹⁻⁴



Structure 1

Impact of Glutathione-Enriched Inactive Dry Yeast Preparations on the Stability of Terpenes during Model Wine Aging

Juan José Rodríguez-Bencomo,[†] Inmaculada Andújar-Ortiz,[†] M. Victoria Moreno-Arribas,[†] Carolina Simó,[†] Javier González,[§] Antonio Chana,[§] Juan Dávalos,[§] and M. Ángeles Pozo-Bayón^{*,†}

[†]Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera 9, Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

[§]Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC), C/Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

ABSTRACT: The impact of the addition of glutathione-enriched Inactive dry yeast preparations (g-IDYs) on the stability of some typical wine terpenes (linalool, α -terpineol, β -citronellol, and nerol) stored under accelerated oxidative conditions was evaluated in model wines. Additionally, the effects of a second type of IDY preparation with a different claim (fermentative nutrient) and the sole addition of commercial glutathione into the model wines were also assessed. Model wines were spiked with the low molecular weight fraction (<3 kDa permeate) isolated from the IDYs, avoiding the interaction of aroma compounds with other yeast components. An exhaustive chemical characterization of both IDY permeates was carried out by using targeted and nontargeted metabolomics approaches using CE-MS and FT-ICR-MS analytical platforms. The findings suggest that the addition of <3 kDa permeate isolated from any of the IDYs employed decreases the loss of typical wine terpenes in model wines submitted to accelerated aging conditions. The g-IDY preparation did indeed release reduced GSH into the model wines, although this compound did not seem exclusively related to the protective effect on some aroma compounds determined in both model wines. The presence of other sulfur-containing compounds from yeast origin in g-IDY, and also the presence of small yeast peptides, such as methionine/tryptophan/tyrosine-containing tripeptide in both types of IDYs, seemed to be related to the antioxidant activity determined in the two permeates and to the minor loss of some terpenes in the model wines spiked with them.

KEYWORDS: inactive dry yeast preparations, glutathione, terpenes, wine oxidation, EC-MS, FT-ICR MS

INTRODUCTION

During wine aging, oxidation can be an undesirable process responsible for important changes in the sensory characteristics of wines, especially white wines. The loss of pleasant aromatic notes produced as a consequence of the decrease of important aroma compounds such as polyfunctional thiols, terpenes, and esters^{1–3} and the accumulation of other undesirable compounds (hydrogen sulfide, methyl mercaptans)⁴ in wines with low exposure to oxygen, which produce the so-called “reduced off flavor”, are mainly responsible for the depreciation in the quality of the wines.

Sulfur dioxide (SO₂) is the most common preservative used in winemaking, not only because of its antioxidant and antioxidasic properties but also because of its antimicrobial action. However, due to existing health concerns derived from the consumption of high concentrations of sulfites, there is a current trend to limit its use during winemaking.⁵ Therefore, different strategies focused on keeping the original aroma characteristics of young wines while aging in the bottle have been proposed. It has been shown that the addition of some sulfur-containing compounds prior to wine bottling might preserve the degradation of certain aromas. Among others, it has been suggested that the addition of glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH) at 10 mg/L prior to bottling might reduce the loss of 3-methylmercaptohexanol in Sauvignon white wines.⁶ More recently, Ugliano and collaborators⁴ remarked that GSH effectiveness might depend on other wine compositional parameters (e.g., the presence of

copper reduces the GSH effect). The protective effect of GSH has also been shown against the loss of some ester and terpene compounds,^{7–9} which are important contributors to pleasant floral and fruity notes in white wines.³ This effect has been ascribed to the GSH free sulfhydryl (SH) moiety, which confers unique redox and nucleophilic properties.^{10–13} It has also been found that GSH mixed with some wine polyphenols (caffeic and gallic acids) or other sulfur-containing compounds, such as N-acetylcysteine, also have a protective effect against wine aroma oxidation.^{14,15}

Despite these promising results, the addition of GSH to wine prior to bottling is a winemaking practice under study by the International Organization of Vine and Wine (OIV). However, other alternatives, such as the use of GSH-enriched inactive dry yeast (g-IDY) preparations could be used to increase the levels of GSH in musts and wines.¹⁶ The so-called IDY preparations are yeast derivatives obtained from *Saccharomyces cerevisiae* grown in a highly concentrated sugar medium and subsequently submitted to different inactivation treatments and manufacturing processes to obtain a variety of commercialized products (inactive yeast, yeast autolysates, yeast walls, and yeast extracts).¹⁶ The use of IDYs is gaining interest within the wine industry because of their large amount of potential

Received: July 1, 2013

Revised: January 13, 2014

Accepted: January 22, 2014

Published: January 24, 2014

applications in winemaking. Among them, as a consequence of its high content in GSH, g-IDYs have been claimed to preserve wine aroma and color during wine storage. Although, as has been recently stated,¹⁷ no literature could be found on the industrial preparation of g-IDYs¹⁵ and it is still not clear whether exogenous GSH enrichment is allowed during the manufacturing process, the release of reduced GSH (the form active against oxidation) into the wines has been recently proven.^{18,19} However, the effectiveness of the GSH released by these preparations on wine oxidation inhibition has not yet been investigated. Andujar-Ortiz and collaborators²⁰ recently revealed significant differences between rosé Grenache wines produced by using a g-IDY preparation and nontreated wines in some sensory aroma attributes but only after 9 months of wine aging. This effect could be attributable to the GSH released from IDY or the stimulating effect of amino acids and other peptides from the IDY on GSH synthesis by yeast under winemaking conditions.^{18,19}

Considering the current interest of the wine industry in the use of g-IDY preparations to preserve the aroma of wines and the lack of published literature on this topic, the aim of this work was to evaluate the effect of a g-IDY preparation on some typical and desirable wine aroma compounds (linalool, α -terpineol, β -citronellol, and nerol) by using model wines submitted to accelerated oxidative conditions. The effect of a second type of IDY preparation with a different claim (fermentative nutrient) and the effect of commercial GSH were also evaluated. To further understand the role of GSH from the IDY formulations, the wines were spiked with the low molecular weight fraction (<3 kDa) obtained by cold ultracentrifugation, avoiding the interaction of other yeast components (glycoproteins) with the aroma compounds.^{21,22} To conclude, chemical characterization of both IDY permeates (<3 kDa fraction) was carried out by using targeted and nontargeted metabolomic approaches using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR-MS) and capillary electrophoresis–mass spectrometry (CE-MS) analytical platforms.

MATERIALS AND METHODS

IDY Samples. Two types of enological IDY preparations were selected for being representative of the current preparations in the enological market and because they are widely used in winemaking: a GSH-enriched IDY (g-IDY) recommended to reduce the oxidation of wine aroma compounds because of the presence of higher amounts of GSH, and an IDY preparation commonly used as fermentation nutrient (n-IDY). The comparison between both types of IDYs (with and without GSH in their composition) should better provide evidence about the role of GSH released by IDY in wine aroma oxidation.

Isolation of <3 kDa Fraction from the IDY Preparations by Ultrafiltration. Four grams of each IDY powder was weighed into 50 mL centrifuge tubes. Samples were extracted with 50 mL of water/ethanol solution (87:13, v/v) in an ultrasonic bath (3 cycles, 5 min each) at 4 °C. The mixture was then centrifuged (15 min at 5000g and 10 °C), and the supernatant was ultrafiltered using a Centricon device (Amicon Inc., Beverly, MA, USA) with a 10 kDa cutoff membrane. The obtained permeates were submitted to a second ultrafiltration step through a 3 kDa cutoff membrane Centricon (Amicon Inc.). Both ultrafiltration steps were carried out at cold temperature (below 10 °C). The obtained <3 kDa permeates from each IDY preparation were freeze-dried and kept at –20 °C until use. Prior to chemical characterization, permeates were reconstituted with water to 100 mg/mL dry residue. Only for FT-ICR-MS analysis were reconstituted samples dialyzed by using a Float-a-Lyzer G2 device with a 0.1–0.5

kDa cutoff membrane from Spectrum (Breda, The Netherlands) to remove salts.

Model Wine Solutions under Accelerated Aging Conditions.

Model wine solutions (50 mL) were prepared in 100 mL vials by adding ethanol (VWR, Leuven, Belgium) at 120 mL/L and 4 g/L tartaric acid (Panreac, Barcelona, Spain). The pH was adjusted at 3.5 using a 5 M NaOH solution (Panreac). Model wines were spiked with single terpene compounds (nerol, β -citronellol, α -terpineol, and linalool) from Sigma (Stenheim, Germany) at a final concentration of 25 mg/L each. Finally, 100 μ L of the reconstituted <3 kDa fractions isolated from g-IDY or n-IDY at 100 mg/mL was added. In addition, another set of model wines were individually aromatized with the four aroma compounds and spiked with commercial GSH (Sigma) to a final concentration of 10 mg/L. Finally, four control model wines, one with each aroma compound but without addition of the IDY fractions or commercial GSH, were also prepared. Two vials of the model wines containing each terpene compound were analyzed at the beginning of the experiment ($t = 0$ days). The different model wine mixtures were submitted to an accelerated oxidation process during 3 weeks at 25 °C, saturating the headspace of the vials with oxygen ($t = 21$ days). All of the preparations were carried out in duplicate.

HS-SPME-GC/MS Analysis. Model wine aroma analysis was performed before ($t = 0$ days) and after ($t = 21$ days) model wine oxidation process. It was carried out by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). Model wine samples (8 mL), 2.3 g of NaCl, and 40 μ L of an internal standards solution (400 mg/L 3,4-dimethylphenol and 2.5 mg/L methyl nonanoate) were added to a 20 mL SPME vial. The SPME procedure and chromatographic conditions were detailed in a previous work.²³ Briefly, the extraction procedure was automatically performed using a CombiPal system (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) with a 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS fiber of 2 cm length from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Samples were preincubated for 10 min at 50 °C, and extraction was performed in the headspace of each vial for 30 min at 50 °C. Desorption was performed in the injector of the GC system in splitless mode for 1.5 min at 270 °C. After each injection, the fiber was cleaned for 20 min to avoid any memory effect. The chromatographic separation was performed in a GC-MS instrument (Agilent 6890GC, Agilent 5973 N MS) equipped with a Supra-Wax fused silica capillary column (60 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.50 μ m film thickness) from Konik (Barcelona, Spain). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature was initially held at 40 °C for 5 min, then increased at 4 °C/min to 240 °C, and held at 240 °C for 20 min. The acquisitions were performed in scan (from 35 to 350 amu) and electronic impact mode (70 eV). Other MS conditions were 270, 150, and 230 °C for the transfer line, quadrupole, and ion source, respectively. The signal corresponding to a specific ion of quantification (m/z 93, 59, 69, and 69 for linalool, α -terpineol, β -citronellol, and nerol, respectively) was calculated by the data system. Compound identification was carried out by comparison of retention times and mass spectra of the reference compounds with those reported in the mass spectrum library NIST 2.0. Data were obtained by calculating the relative peak area (RPA) in relation to that of the corresponding internal standard (3,4-dimethylphenol, for all of the aroma compounds except for nerol, which was methyl nonanoate).

Analysis of Reduced Glutathione (GSH), Total Glutathione, and γ -Glutamylcysteine (γ -glu-cys) by RP-HPLC-FL. Reversed-phase HPLC using a liquid chromatograph consisting of a Waters 600 Controller programmable solvent module (Waters, Milford, MA, USA), a WISP 710B autosampler (Waters), and a HP 104-A fluorescence detector (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) was used following the procedure previously optimized and validated.¹⁸ The mobile phase was composed of methanol (Lab-Scan, Sowinskiego, Poland) and an aqueous solution of phosphate buffer (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ at pH 8.5) with a ratio of 15:85 (v/v). The sample (30 μ L) was placed in a 1 mL vial (by using an insert), and the precolumn derivatization was automatically made in the autosampler at 12 °C as follows: to a sample vial were added 105 μ L of the dithiothreitol (Sigma-Aldrich) solution vial [5 mM and 0.5 mM in

borate buffer (0.2 M H_3BO_3 , pH 9.2) to determine total GSH or reduced GSH, respectively] and 15 μL of 2,3-naphthalenedialdehyde (NDA) (Sigma-Aldrich) solution (5 mg mL^{-1} in ethanol); then, two mixture cycles of the total content of the insert were carried out, and 100 μL was injected in the chromatographic system. Separation was carried out on a Nova Pack C18 (150 mm \times 3.9 mm i.d., 60 Å, 4 μm) column (Waters) in isocratic mode (flow at 1 mL min^{-1}), and detection was performed by fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 467 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 525 \text{ nm}$). The derivatization conditions for the determination of γ -glutys were the same as previously described. Calibrations were carried out by using pure standard compound solutions of GSH and γ -glu-cys. The analysis of the samples was made in duplicate.

ORAC-Fluorescein (ORAC-FL) Assay. The antioxidant capacity of IDY permeates and GSH was measured by ORAC-FL assay based on that proposed previously.²⁴ Briefly, the reaction was carried out at 37 °C in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4), and the final assay mixture (200 μL) contained FL (70 nM), AAPH (12 mM), and antioxidant [Trolox (1–8 μM) or sample at different concentration]. The plate was automatically shaken before the first reading, and the fluorescence was recorded every minute for 80 min. A polarstar Galaxy plate reader (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Germany) with 485-P excitation and 520-P emission filters was used. The equipment was controlled by Fluostar Galaxy software (version 4.11-0) for fluorescence measurement. Black 96-microwell microplates (96F untreated, Nunc, Denmark) were used. AAPH and Trolox solutions were prepared daily, and FL was diluted from a stock solution (1.17 mM in 75 mM phosphate at pH 7.4). Fluorescence measurements were normalized to the curve of the blank (no antioxidant). From the normalized curves, the area under the fluorescence decay curve (AUC) was calculated. The regression equation between net AUC and antioxidant concentration was calculated, and the slope of the equation was used to calculate the ORAC-FL value by using the Trolox curve obtained for each assay. Final ORAC-FL values were expressed as micromoles of Trolox equivalent per milligram of dry permeate (for the <3 kDa permeates from g-IDY and n-IDY) and in micromoles of Trolox equivalent per milligram of pure compound for commercial GSH.

Total Free Amino Acids and Peptides. Free amino acids and peptides in model wine were determined according to the protocols proposed by Doi and co-workers.²⁵ Free amino acids were determined by the reaction of ninhydrin/Cd with the free amino group by measuring the absorbance at 507 nm (method S).²⁵ On the other hand, free amino acids plus peptides were determined by the reaction of the amino group with ninhydrin/Sn by measuring the absorbance at 570 nm (method I).²⁵ A DU 70 spectrophotometer from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) was used. Quantification was carried out on the basis of the standard curve of leucine, and results were expressed as milligrams N/L. All of the model wine samples were analyzed in duplicate.

Analysis of Amino Acids by RP-HPLC-FL. Amino acids were analyzed in duplicate by reversed-phase HPLC using a liquid chromatograph as described under Analysis of Reduced Glutathione (GSH), Total Glutathione, and γ -Glutamylcysteine (γ -glu-cys) by RP-HPLC-FL. Samples were submitted to automatic precolumn derivatization with *o*-phthaldehyde (OPA) in the presence of 2-mercaptoethanol following the method described by Moreno-Arribas and collaborators.²⁶ Separation was carried out on a Waters Nova Pack C18 (150 \times 3.9 mm i.d., 60 Å, 4 μm) column and the same type of precolumn. Detection was performed by fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 425 \text{ nm}$).

Analysis of Sulfur-Containing Metabolites by CE-MS. CE analyses were carried out in a P/ACE 5500 CE apparatus from Beckman Coulter. The CE system was coupled to a TOF MS instrument from Bruker Daltonics (Bremen, Germany) through an orthogonal ESI interface model G1607A from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Electrical contact at the ESI needle tip was established via a sheath liquid delivered by a 74900-00-05 Cole Palmer syringe pump (Vernon Hills, IL, USA). The electrophoretic separation was carried out using an uncoated fused-silica capillary (50 μm internal diameter, 363 μm outside diameter, and 80 cm total length) from

Composite Metal Services (Worcester, UK). Before first use, the separation capillary was conditioned by rinsing with 1 M NaOH for 10 min, followed by 20 min with water, both using pressurized N_2 at 20 psi (1380 mbar). After each run, the capillary was conditioned with water during 2 min, followed by BGE during 4 min. Injections were made at the anodic end using N_2 pressure at 0.5 psi (34.5 mbar) for 80 s. Electrophoretic separation was achieved by applying +25 kV at room temperature in a BGE composed of 3 M formic acid. Electrical contact at the ESI needle tip was established via a sheath liquid based on isopropanol/water (50:50, v/v) and delivered at a flow rate of 0.24 mL/min . The mass spectrometer operated in the positive ion mode. The nebulizer and drying gas conditions were 0.4 bar N_2 and 4 L/min N_2 , respectively, and the ESI chamber temperature was maintained at 250 °C. Spectra were acquired in the m/z 50–700 range every 90 ms. External and internal calibration of the TOF MS instrument was performed by introducing a 10 mM sodium formate solution through the separation capillary. The ions used for the calibration of the TOF MS instrument were next: m/z 90.9766, 158.9641, 226.9515, 294.9389, 362.9263, 430.9138, 498.9012, and 566.8886. TOF MS provided a high mass resolution and high mass accuracy with errors usually below 10 ppm. Selected mass spectra were processed through the software DataAnalysis (Bruker Daltonics), which provided a list of possible elemental formulas by using the Generate-Molecular Formula Editor (Bruker Daltonics), which provided standard functionalities such as minimum/maximum elemental range, electron configuration, and ring-plus double bond equivalents, as well as a comparison between the theoretical and experimental isotopic pattern (Sigma-Value) for increased confidence in the theoretical molecular formula assignment.

Nontargeted Metabolomic Analysis by FT-ICR MS. FT-ICR MS was used to obtain ultrahigh-resolution (>100,000) mass spectra. Separation and identification of the metabolites were possible without the need of chromatography or derivatization due to the ultrahigh mass accuracy. Commercial beer maltooligosaccharides were used as mass calibrants and tuning standards in both the positive and negative ion modes.²⁷ The maximum mass error achieved was below 2 ppm.

Experiments were performed on a hybrid triple-quadrupole-FT-ICR instrument Varian 920 MS provided with a 7.0 T actively shielded superconducting magnet and equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The conditions in the electrospray were as follows: In positive mode the potential in the needle was set at 4.5 kV and 600 V in the shield. The capillary potential to pass the ions from the source to the skimmer was set in a range between 40 and 60 V. Nitrogen was employed as nebulizer gas, and its pressure was 50 psi. The pressure for drying gas was set at 18 psi and the temperature at 300 °C. The flow rate of the sample was kept at 15 $\mu\text{L/min}$ and injected by direct infusion. In negative mode MS parameters were as follows: –3.5 kV, 600 V, from –70 to –90 V in the capillary, 18 psi, and 300 °C. Sample flow rate was 15 $\mu\text{L/min}$. Air was used instead of nitrogen as nebulizer gas. The spectra were acquired in full scan mode, defining a mass range from m/z 100 to 1000. The internal detection signal in the cell detector of the FT-ICR was optimized for a mass of m/z 500.

Monoisotopic mass and isotope cluster profiles were extracted from the raw data by using Varian MS Peak Hunter software version 4.1.89. These two parameters were used by the same software to get the elemental composition following the next criteria: error was set at 2 ppm, and only chemical formulas containing C, H, N, O, P, and S were allowed. The spectra were exported to mzXML format and applied against XCMS²⁸ online METLIN database. When the results from the METLIN database were in good agreement in accordance with the chemical formula found in Varian MS Peak Hunter, the metabolite was given as a good result.

Statistical Analysis. Data from the analysis of aroma compounds (RPAs) from the model wine experiments were submitted to one-way ANOVA and LSD to test the effect of wine treatment.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of the Addition of GSH and the <3 kDa Permeates Isolated from IDYs on Specific Wine

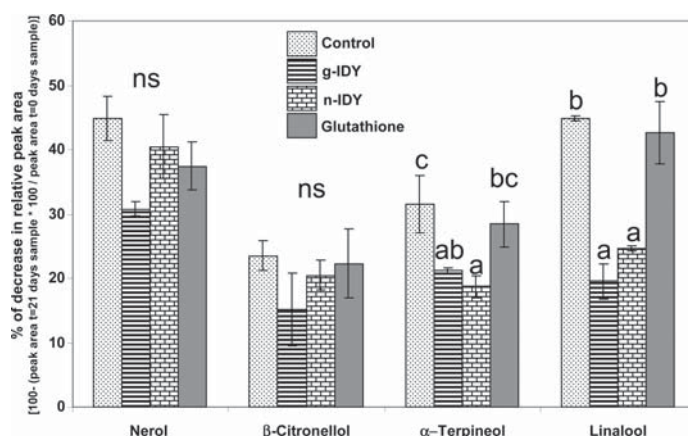


Figure 1. Percentage of decrease in the relative peak area of the aroma compounds in the model wines submitted to accelerated aging conditions (wines supplemented with the <3 kDa permeates isolated from g-IDY and n-IDY, wines with added 10 mg/L of commercial glutathione, and control wines without any treatment) compared to the original model wines (0 days). Results of ANOVA and LSD test are indicated with different letters (a–c). ns: no significant differences.

Terpenes in Model Wines under Accelerated Aging Conditions.

To determine the effect of GSH-enriched IDY preparations on the evolution of aroma compounds during aging and whether the GSH released from IDYs into the wines might have a role in the behavior of aroma compounds during aging, the <3 kDa permeate from a g-IDY preparation was isolated by ultracentrifugation and spiked into model wines, as described under IDY Samples. Model wines spiked with this permeate were coded g-IDY-W. Ultrafiltration ensured the removal of glycoproteins (with molecular masses >3 kDa) from the IDY preparations that might interact with volatiles,^{21,22} masking the potential action of GSH on the aroma compounds, which was the main objective of this study. In addition, to compare the effect of a different type of IDY preparation currently commercialized as a fermentation nutrient (without any claim on wine aroma protection), the <3 kDa permeate was also isolated and added to model wines (n-IDY-W). In addition, two other types of model wines with added commercial GSH (10 mg/L) referred to as glut-W and control model wines, without any addition (cont-W), were also prepared. To avoid chemical transformations due to the high reactivity of terpene compounds,³ each model wine solution was individually aromatized with a single aroma compound (nerol, β-citronellol, α-terpineol, and linalool). These aromas were selected because they are characteristic of young wines providing pleasant floral-fruity nuances and are very sensitive to the oxidation phenomena.^{3,29,30} The behavior of the four terpene compounds was evaluated in all of the model wines at the beginning of the experiment ($t = 0$ days), corresponding to nonoxidized model wines, and after 3 weeks of accelerated aging conditions ($t = 21$ days). Figure 1 shows the percentage of decrease in relative peak area (RPA) between the initial wine sample (nonoxidized) and the wines after 21 days of aging for each aroma compound and wine type. As can be seen, there was a general decrease in RPAs for all of the aromas during aging, which ranged from 24 to 45%, therefore confirming the outstanding effect of aging on the loss produced in these types of aroma compounds,^{2,3,14} which can be attributable to oxidation phenomena.^{3,29,30} Interestingly, compared to the

control wine solution, α-terpineol and linalool showed a lower reduction in RPAs in the model wines supplemented with the <3k Da permeate isolated from either of both preparations (g-IDY or n-IDY). In the case of nerol, a slightly lower reduction in RPAs was also observed in the g-IDY model wine, although this effect was not statistically significant. β-Citronellol did not show a significant effect either. These results seemed to indicate a protective effect of these preparations on some specific aroma compounds, which is in agreement with the aroma sensory differences recently found between control rosé wines (without IDY added) and rosé wines produced in cellar conditions with the same type of g-IDY after 9 months of aging.²⁰

However, the addition of commercial GSH to the model wine solutions did not have a significant effect under the essayed conditions. Different published works have shown an inhibition of the decline of certain aroma compounds when using GSH at a similar or even lower dosage in wines or model wine systems.^{4,6–9} Nonetheless, it is well-known that the main effect of GSH in wines is its ability to react with *o*-quinones produced by oxidation of caffeic acid (and other polyphenols) to give grape reaction product (GRP) by the action of polyphenol oxidases blocking the subsequent steps in which polyphenols are involved (polymerization) and responsible for browning.^{4,6,17} Moreover, *o*-diphenols can be directly oxidized in the presence of oxygen and some cations (iron, copper) to *o*-quinones and hydrogen peroxide, which might be involved in subsequent aroma oxidation.⁴ In our experimental conditions this action mechanism was limited because of the absence of polyphenols to react with GSH in the model wine, which seems to explain the absence of a noticeable effect of GSH on aroma protection in the model wines supplemented with commercial GSH. However, GSH presents scavenging hydroperoxide and hydroxyl radical properties, which might have allowed it to act as an antioxidant by other mechanisms different from its capacity to interact with *o*-quinones in polyphenol-free systems.^{10,11} Nonetheless, on the basis of our results, this mechanism did not seem as significant in our experimental conditions. Despite this, it is important to highlight that this model system allowed us to uncover the potential role of other

yeast components, different from GSH and contained in the <3 kDa fraction, which seemed to be related to the protection of some terpenes in model wines submitted to accelerated aging conditions.

Following this rationale, to find out if the observed reduction in peak areas for some of the terpenes employed in our study was effectively related to an antioxidant effect exerted by the IDY permeates, the radical scavenging activity of both of them was calculated by using the ORAC-FL method. The ORAC values were 0.33 and 0.22 $\mu\text{mol TE/mg dry permeate}$ for g-IDY and n-IDY permeates, respectively, showing that the two permeates had a positive and similar antioxidant capacity. These results are in agreement with the previous experiment, in which g-IDY-W and n-IDY-W wines showed a similar reduction in the corresponding peak areas for the same aroma compounds (linalool and α -terpineol). In addition, to confirm the antioxidant activity of the commercial GSH employed in this experiment, the ORAC value for the pure compound was also calculated; this is 10.7 $\mu\text{mol TE/mg pure compound}$, thus corroborating its high antioxidant capacity, comparable to other important wine antioxidants such as polyphenols. As an example, for a representative set of pure polyphenolic compounds, the calculated ORAC values ranged between 2.35 and 18.16 $\mu\text{mol TE/mg pure compound}$ determined for myricetin and caffeic acid, respectively.³¹ Nevertheless, and as previously stated, despite the high antioxidant activity determined for GSH, this compound did not exert a noticeable effect in preventing aroma oxidation in a model wine in the absence of polyphenols, as used in the present work. However, these results confirmed the antioxidant properties of both IDY permeates in agreement with the better preservation of some terpenes observed in the model wines supplemented with them. However, this effect, at least in the g-IDY wines, might have been a consequence of the higher amount of GSH contained in the g-IDY permeate compared to that added into the wines by using commercial GSH (10 mg/L), which on the basis of its radical scavenging properties might be responsible for the lower aroma loss in g-IDY wines. Therefore, a quantitative determination of GSH, total GSH, and the precursor γ -glutamylcysteine, was carried out.

Determination of GSH, Total GSH, and γ -Glutamylcysteine. Reduced GSH, total GSH, and the precursor γ -glutamylcysteine were analyzed by using a previously optimized RP-HPL-FL method.¹⁸ These results are shown in Table 1. As can

Table 1. Concentration of Total GSH, Reduced GSH, and γ -Glutamyl-cysteine Determined in the <3 kDa Permeates Isolated from g-IDY and n-IDY Preparations

IDY preparation	total GSH (mg/L)	reduced GSH (mg/L)	γ -glutamyl-cysteine (mg/L)
g-IDY	3147 \pm 118	1293 \pm 76	873 \pm 63
n-IDY	nd ^a	nd	nd

^and, not detected.

be seen, only the g-IDY permeate presented detectable levels of GSH (1293 mg/L) and γ -glutamyl-cysteine (873 mg/L). The amount of total GSH was higher (3147 mg/L), meaning that only 41% of glutathione was in its reduced form (GSH) and available to act as a potential antioxidant. However, in the n-IDY permeate, there were traces of GSH or GSH-related compounds. This is in agreement with some previously published works in which in a screening of commercial

enological IDY preparations, only those claimed to be GSH-enriched IDY preparations released reduced GSH into synthetic wines.¹⁸ With the amount of each permeate added into the model wines (100 μL) taken into consideration, the final amounts of reduced and total GSH in g-IDY-W model wines were 2.6 and 6.3 mg/L, respectively, which are very close to the amounts determined in model wines when using IDYs at the recommended wine dosage (0.3 g IDYs/L), which has been established to be between 1 and 2.5 mg/L.^{18,19} Considering that no GSH (or other GSH-related compounds) was detected in n-IDY-W model wine and that the amount of GSH determined in g-IDY-W was lower than the amount of commercial GSH employed in the GSH-W model wine (10 mg/L), it could be concluded that the observed antioxidant effect of these preparations on the reduction of aroma loss during wine aging did not seem to be linked to the sole antioxidant action of GSH but could be due to other compounds or to the combined action of GSH and other antioxidant compounds from yeast origin present in the permeates (at least in n-IDY-W model wine). In the attempt to elucidate these compounds, a comprehensive chemical characterization of both g-IDY and n-IDY permeates was carried out.

Analysis of Other Sulfur-Containing Compounds by CE-MS. In addition to GSH, other biological sulfur-containing compounds have been said to present antioxidant properties.³² Thus, the analysis of other low molecular weight sulfur-containing compounds in the <3 kDa permeates from both g-IDY and n-IDY samples was performed by using CE-MS. This targeted analysis was carried out on the basis of the presence of at least one S atom in the molecular structure. The existence of sulfur in the molecule requires the presence in the mass spectra of an isotopic peak 2 Da higher than the molecular ion and at least 4% in intensity per sulfur. After further inspection of n-IDY and g-IDY CE-MS profiles, besides the 2 sulfur-containing amino acids methionine and cysteine, another 14 highly abundant sulfur-containing compounds were found in the permeate from the g-IDY sample. In Figure 2, extracted ion electropherograms (EIEs) from these two amino acids and the most abundant sulfur-containing compounds are represented (continuous and dotted lines for g-IDY and n-IDY samples, respectively). The electropherogram from n-IDY showed, however, only three major peaks (compounds 1, 3, and 5), and methionine and cysteine were not detected either. Detailed information about the identity of these compounds is shown in Table 2. As can be seen in this table, 8 of 14 compounds could be tentatively identified. Most of them corresponded to glutathione derivatives (compounds 7, 8, 10, 11, and 14) and, in general, the rest of the identified compounds were compounds related to the amino acids cysteine and methionine. Many sulfur compounds, including the sulfur-containing amino acids, have been shown to exhibit antioxidant properties in vivo and in vitro,^{32,33} and all of them are synthesized from methionine.^{29,33} Therefore, the absence of this amino acid in the n-IDY permeate is in agreement with the lack of sulfur-containing compounds in this sample. In synthetic wines, Papadopoulou and Roussis⁸ showed that some sulfur-containing compounds, such as *N*-acetylcysteine, are effective at decreasing the rate of reduction of some aroma compounds (including terpenes) during wine aging. On the basis of existent literature and the chemical structure of the sulfur-containing compounds identified in g-IDY, the involvement of these compounds in the antioxidant activity determined in the model

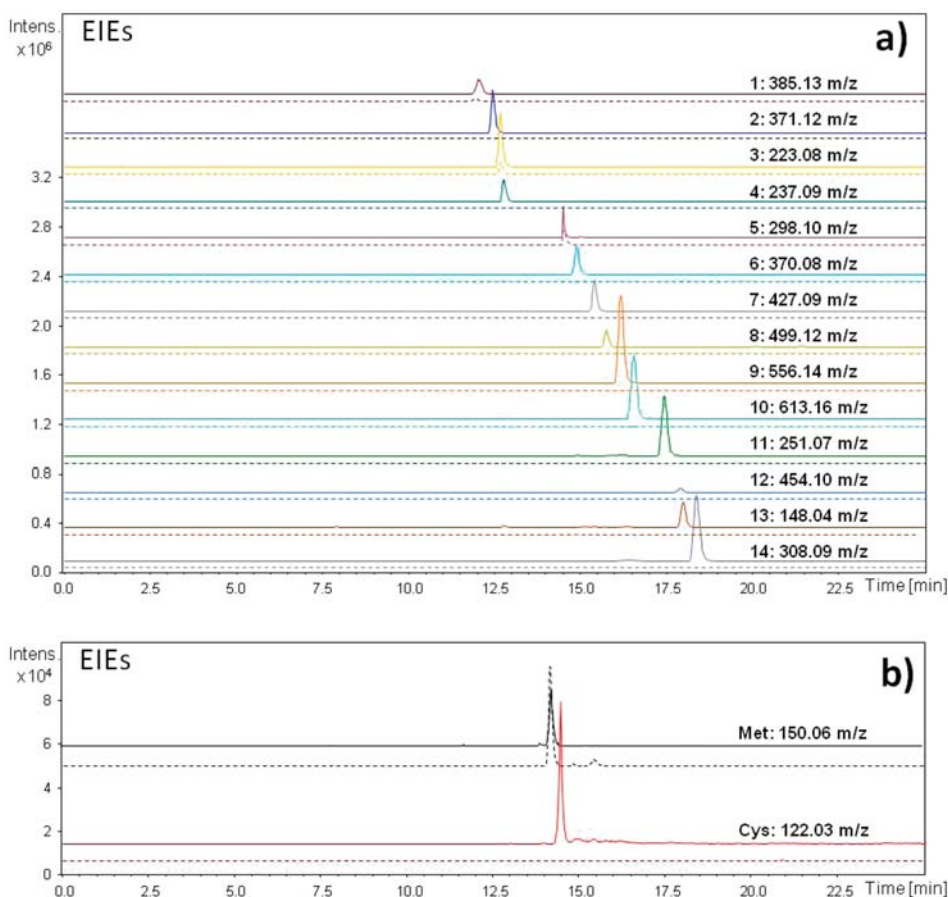


Figure 2. CE-TOF-MS extracted ion electropherograms (EIEs) of (a) the 14 most abundant sulfur-containing compounds and (b) methionine and cysteine from g-IDY and n-IDY samples. A continuous line for g-IDY permeate and a dotted line for n-IDY permeate are used. See Analysis of Sulfur-Containing Metabolites by CE-MS for experimental conditions.

wines spiked with the g-IDY permeate seems plausible. However, the absence of sulfur-containing compounds in the n-IDY permeate might indicate that the antioxidant effect determined in n-IDY-W model wines should be due to compounds from a different nature.

Analysis of Nitrogen-Containing Compounds. Previous works have already shown that free amino acids represent the greatest nitrogen fraction released by IDYs into model wines, the specific composition of which depends on the type of IDYs.²² In addition, the antioxidant effect exerted by different types of nitrogen compounds such as peptides and amino acids (other than sulfur-containing amino acids) has also been described.^{34,35} Therefore, to determine which other chemicals might be responsible for the antioxidant effect found in both permeates, their nitrogen composition was determined. Table 3 shows the content of total free amino acids, free amino acids and peptides, and individual amino acids determined by RP-HPLC-FL. As can be seen, both permeates exhibited important qualitative and quantitative differences. First, the content of free amino acids was clearly higher in the g-IDY permeate (2964 mg

N/L) than in the n-IDY permeate (1248 mg N/L). However, the n-IDY permeate was richer in N from peptides. Besides, the amino acid profile showed important differences between IDYs. For instance, the major amino acids in g-IDY permeate were glutamic acid (62.2 mg/L), threonine (56.27 mg/L), and β -alanine (45.82 mg/L), whereas histidine (56.39 mg/L), glycine (33.15 mg/L), and lysine (21.99 mg/L) were most abundant in the permeate from n-IDY. Some amino acids have been associated with relatively important radical scavenging activities in the order tryptophan > tyrosine > methionine > cysteine > phenylalanine.³⁴ In this sense, only tyrosine was detected in the free form in both permeates, although in relatively low concentrations (5.6 and 1.05 mg/L for g-IDY and n-IDY permeates, respectively), whereas phenylalanine and tryptophan were not detected in any of the samples. Corroborating the previous results obtained by CE-MS, methionine was identified only in the g-IDY permeate (1.55 mg/L). However, the analytical method employed did not allow the detection of cysteine, although its sole presence in the g-IDY permeate was previously confirmed by CE-MS analysis. Therefore, consider-

Table 2. Tentative Identification of Sulfur-Containing Compounds Found in the <3 kDa Permeates Isolated from g-IDY and n-IDY Preparations after CE-MS Analysis

compd	time (min)	peak area (g-IDY)	peak area (n-IDY)	<i>m/z</i>		error (ppm)	formula	tentative ID	HMDB ^a code
				exptl	theor				
1	12.03	1489462	204104	385.1318	385.1289	7.6	C ₁₄ H ₂₀ N ₆ O ₅ S	S-adenosylhomocysteine	HMDB00939
2	12.45	2807046	ND ^b	371.1182				NF ^c	
3	12.68	3650062	782426	223.0792				NF	
4	12.75	1427597	ND	237.091	237.09034	−2.7	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₄ S	methionyl-serine, serinyl-methionine, S-aminomethylhydroipoamide	HMDB29045, HMDB29045, HMDB06239
5	14.49	891150	740927	298.1011	298.0968	−14.3	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	5'-methylthioadenosine	HMDB01173
6	14.87	2142027	ND	370.0768				NF	
7	15.41	2245896	ND	427.0974	427.0952	−5.2	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₈ S ₂	S-glutathionyl-L-cysteine	HMDB00656
8	15.74	3898205	ND	499.1182	499.116311	−3.8	C ₁₆ H ₂₆ N ₄ O ₁₀ S ₂	N,N'-bis(γ-glutamyl)-cystine	HMDB38458
9	16.18	7992966	ND	556.1404	278.5817			NF	
10	16.55	6240395	ND	613.16, 307.0921	613.1592	−2.5	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	oxidized glutathione	HMDB03337
11	17.43	5710438	ND	251.0716	251.0696	−7.9	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₅ S	γ-glutamyl-cysteine	HMDB01049
12	17.9	369996	ND	454.096				NF	
13	17.98	2125131	ND	148.0446				NF	
14	18.37	6861257	ND	308.0952	308.0911	−13.4	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	glutathione	HMDB00125

^aHMDB, Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>). ^bND, not detected. ^cNF, not found.

Table 3. Amino Acid Composition (Milligrams per Liter) of the <3 kDa Permeates Isolated from g-IDY and n-IDY Preparations

amino acid	g-IDY		n-IDY	
	mean	±SD	mean	±SD
free amino acids	2964	342	1248	22
free amino acids and peptides	2865	29	1604	74
aspartic acid	19.56	0.51	18.66	0.48
glutamic acid	62.21	2.31	nd ^a	
asparagine	7.88	0.17	5.17	0.11
serine	15.75	0.53	6.60	0.22
glutamine	21.57	0.37	10.62	0.18
histidine	24.53	0.65	56.40	1.50
glycine	nd		33.15	1.08
threonine	56.43	1.51	12.77	0.34
arginine	8.79	0.22	6.95	0.17
β-alanine	45.82	0.32	4.43	0.03
α-alanine	nd		3.41	0.10
γ-aminobutyric acid	4.01	0.14	4.05	0.14
tyrosine	5.70	0.08	1.05	0.01
α-aminobutyric acid	2.61	0.02	2.51	0.02
methionine	1.59	0.01	nd	
valine	2.32	0.05	1.76	0.04
phenylalanine	nd		nd	
tryptophan	nd		nd	
isoleucine	4.38	0.11	4.67	0.11
leucine	nd		nd	
ornithine	27.75	0.48	5.43	0.09
lysine	31.47	0.54	22.00	0.37

^and, not detected.

ing the amino acidic profile, the contribution of free amino acids to the total antioxidant activity of g-IDY and n-IDY permeates did not seem very relevant, meaning that there were still other compounds which should be more related to this activity.

Nontargeted Metabolomic ESI FT-ICR MS Analysis. Direct infusion ESI-FT-ICR-MS was further employed to gain

insight into the chemical metabolites responsible for the antioxidant effect exerted by the two permeates. This technique has been proposed as one of the best techniques to directly investigate complex natural mixtures³⁶ due to the high mass resolving power and mass accuracy. It has also been recently applied to food materials such as coffee³⁷ and other metabolomic studies of natural products.³⁸

Panels a and b of Figure 3 show the ESI-FT-ICR-MS spectra from g-IDY and n-IDY permeates, respectively. Although they were acquired in the positive and negative ion mode, Figure 3 depicts only the MS from the positive mode. Visually, it is possible to see that both MS profiles were substantially different. This is in good agreement with the more thorough ion identification study that was performed and summarized in Table 4. Using positive and negative ionization modes, it was possible to tentatively identify a total of 10 compounds, 8 of which were detected in the g-IDY permeate and only 4 in the n-IDY permeate. Some of the identified compounds were sulfur-containing compounds, such as S-glutathionyl-L-cysteine, γ-glutamyl-cystine, and oxidized glutathione, which were already identified by CE-MS in the g-IDY sample. In addition, the ion *m/z* 556.1379 was identified as a biotinil-5-AMP, an intermediary in the synthesis of biotin.³⁹ This compound was already detected but not identified by CE-MS in the g-IDY permeate. In any case, in agreement with the results obtained from other analytical techniques (HPLC-FL, CE-MS), there were non-sulfur-containing compounds in the n-IDY permeate. However, a very interesting finding was the detection in both samples of some small peptides, specifically tripeptides. Two of them were found in both permeates and were tentatively identified as histidine/cysteine/lysine- and methionine/lysine/histidine-containing peptides. Their MS and chemical structures are shown in Figure 4. Because of their low concentration in the sample, it was not possible to confirm their sequence. Even more interestingly was the finding of another two peptides only in the n-IDY permeate containing methionine/aspartic/tryptophane and tyrosine/histidine/methionine (Figure 4). It is worth mentioning that the antioxidant properties of small peptides, mainly contained in fermented food, have been

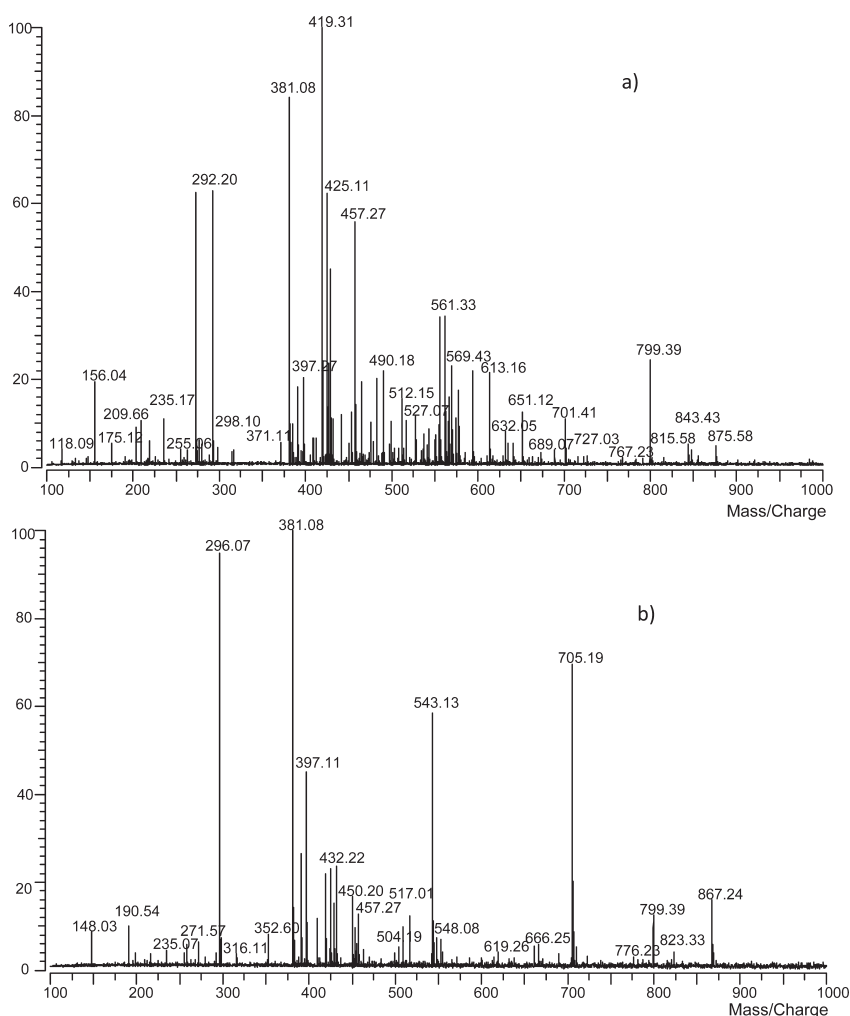


Figure 3. ESI (+) FT-ICR MS of the <3 kDa permeate from g-IDY (a) and n-IDY (b) samples.

Table 4. Tentative Identification of the Compounds Found in the <3 kDa Permeates Isolated from g-IDY and n-IDY Preparations after FT-ICR-MS Analysis

<i>m/z</i>		error (ppm)	formula	g-IDY	n-IDY	tentative ID	METLIN ID	HMDB code
exptl	theor							
399.1447	399.1451	1.0	C ₁₅ H ₂₂ N ₆ O ₅ S + H			S-adenosylmethionine	6064	HMDB01185
425.1137	425.1131	1.4	C ₁₇ H ₂₂ N ₆ O ₆ S + H - H ₂ O	*		S-(4-nitrobenzyl)glutathione	4098	
425.1364	425.1368	0.9	C ₁₅ H ₂₆ N ₆ O ₄ S + K	*	*	His, Cys, Lys	21589	HMDB04220
427.0949	427.0952	0.7	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₆ S ₂ + H	*		S-glutathionyl-L-cysteine	63433	
431.1416	431.1394	5.1	C ₂₀ H ₂₆ N ₆ O ₆ S - H ₂ O - H		*	Met, Asp, Trp	18421	HMDB04220
453.1675	453.1681	1.3	C ₁₇ H ₃₀ N ₆ O ₄ S + K	*	*	Met Lys His	21819	
470.1526	470.1479	10.0	C ₂₀ H ₂₇ N ₆ O ₅ S + Na - 2H		*	Tyr, His, Met	18106	HMDB04220
499.1173	499.1163	2.0	C ₁₆ H ₂₆ N ₄ O ₁₀ S ₂ + H	*		N,N'-bis(γ-glutamylcystine)	63634	
556.1371	556.1379	1.4	C ₂₀ H ₂₈ N ₆ O ₆ PS + H - H ₂ O	*		biotinyl-5'-AMP	58228	HMDB04220
561.3273	561.3235	6.8	C ₂₈ H ₃₀ N ₄ O ₃ S + K	*		oleic acid-biotin	45287	
613.1599	613.1598	0.2	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂ + H	*		oxidized glutathione	45	

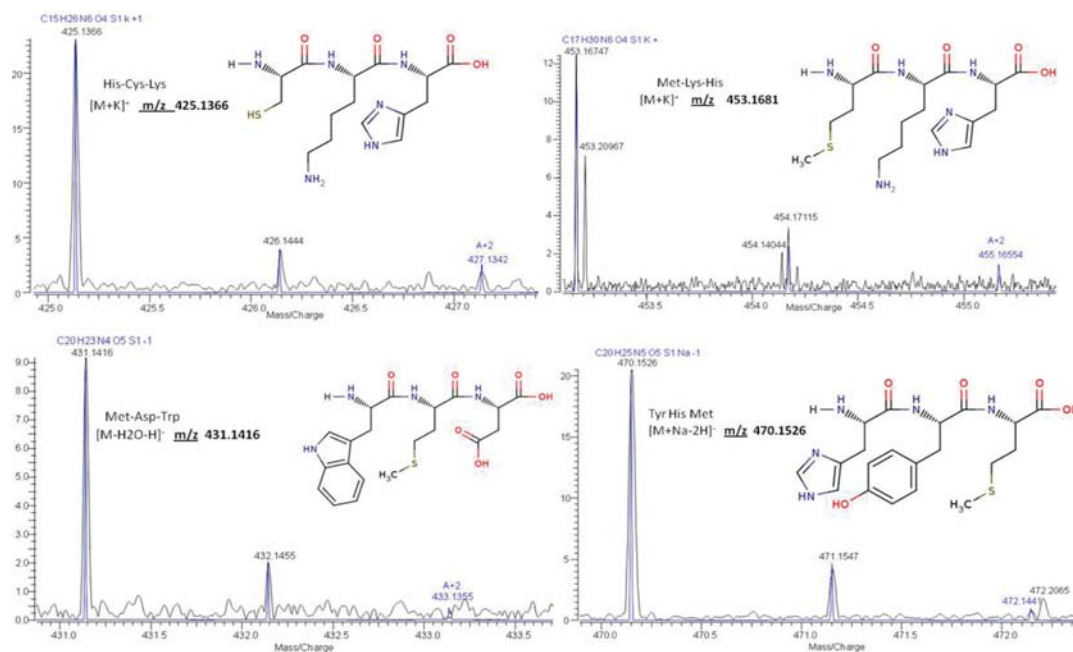


Figure 4. Chemical structures and EI-FT-ICR MS corresponding to the peptides identified in the <3 kDa permeates from g-IDY and n-IDY. Met/Asp/Trp and Tyr/His/Met were identified only in the permeate from n-IDY.

extensively documented.³⁵ As was previously commented, small peptides containing tryptophan, tyrosine, methionine, cysteine, and phenylalanine have been described to exhibit a high antioxidant activity.³⁴ In the present study, from the two peptides detected in the permeates from g-IDY and n-IDY, only one (histidine/cysteine/lysine) had an amino acid (cysteine) that could be involved in the antioxidant properties. However, the two peptides exclusively identified in the n-IDY permeate (methionine/aspartic acid/tryptophan and tyrosine/histidine/methionine) contained two of these amino acids each. In addition, both peptides contained tryptophan and tyrosine, the two most highly antioxidant amino acids. Previously published works have already described the biological activities (antioxidant, antihypertensive) of peptides from yeast origin found in synthetic wines submitted to autolytic conditions⁴⁰ and in red wines,^{41,42} although their chemical structures remained unresolved. Moreover, considering these results, the preservation of aroma and reduction of aroma loss in wines aged on lees that has been linked to the GSH released by yeast autolysis⁶ might also be attributable to other types of small peptides, which could have even greater antioxidant properties than GSH.

In conclusion, it has been proven that the use of IDY preparations (with or without GSH) reduces the loss of certain terpenes during the accelerated aging of model wines. It has also been shown that g-IDY preparations do in fact contain GSH in their reduced state, which can contribute to the aroma preservation in model wines, but they also contain other sulfur compounds of yeast origin that might also act as antioxidants. In addition, both g-IDY and n-IDY contained small peptides (tripeptides) with methionine, tryptophan, and tyrosine, which seem to be involved in the antioxidant properties determined in

the permeates isolated from both IDYs, also being effective in the preservation of some terpenes during model wine aging. Because of the instability of GSH in wines (easily oxidized, fast combination with polyphenols, etc.), this finding could be of technological interest, assuming the higher stability of these antioxidant peptides when used, for example, after wine bottling. Subsequent work will be directed to unequivocally identify the sequence of these compounds, and further studies are needed to confirm the antioxidant effect of these peptides in closer winemaking conditions. Undoubtedly, this will be interesting for the wine and biotechnological industry to redirect the formulation of IDY preparations to achieve specific and effective winemaking applications.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(M.A.P.B.) Phone: +34 910 017 961. Fax: +34 910 017 905. E-mail: m.delpozo@csic.es.

Funding

This work was funded by the MINECO (AGL2012-04172-C02-01) and CONSOLIDER INGENIO 2010 (FUN-C-FOOD, CSD2007-063, Projects) and by Agrovín, S.A. (I+D 20132446 Contract). J.J.R.B. thanks CSIC for the JAE-doc contract.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Hernández-Ledesma for her valuable assistance during the ORAC-FL analysis.

REFERENCES

- (1) Escudero, A.; Asensio, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chem.* **2002**, *77*, 325–331.
- (2) Ferreira, V.; Escudero, A.; Fernandez, P.; Cacho, J. F. Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **1997**, *205*, 392–396.
- (3) Marais, J. Terpenes in the aroma of grapes and wines: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1983**, *4*, 49–58.
- (4) Ugliano, M.; Kwiatkowski, M.; Vidal, S.; Capone, D.; Siebert, T.; Dieval, J.-B.; Aagaard, O.; Waters, E. J. Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2564–2572.
- (5) Pozo-Bayon, M. A.; Monagas, M.; Bartolome, B.; Moreno-Arribas, M. A. Wine features related to safety and consumer health: an integrated perspective. *Crit. Rev. Food Sci.* **2012**, *52*, 31–54.
- (6) Dubourdiou, D.; Lavigne-Cruège, V. The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine. *Vinidea.net* **2004**, 02.
- (7) Papadopoulou, D.; Roussis, I. G. Inhibition of the decline of linalool and α -terpineol in muscat wines by glutathione and N-acetylcysteine. *Ital. J. Food Sci.* **2001**, *13*, 413–419.
- (8) Papadopoulou, D.; Roussis, I. G. Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine. *Int. J. Food Sci.* **2008**, *43*, 1053–1057.
- (9) Roussis, I. G.; Lambropoulos, I. G.; Tzimas, P. Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 274–278.
- (10) Fahey, R. C.; Sundquist, A. R. Evolution of glutathione metabolism. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1991**, *64*, 1–53.
- (11) Field, J. A.; Thurman, E. M. Glutathione conjugation and contaminant transformation. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 1413–1418.
- (12) Penninckx, M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 737–742.
- (13) Penninckx, M. J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* **2002**, *2*, 295–305.
- (14) Roussis, I. G.; Lambropoulos, I.; Papadopoulou, D. Inhibition of the decline of volatile esters and terpenols during oxidative storage of Muscat-white and Xinomavro-red wine by caffeic acid and N-acetylcysteine. *Food Chem.* **2005**, *93*, 485–492.
- (15) Roussis, I. G.; Sergianitis, S. Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour Fragrance J.* **2008**, *23*, 35–39.
- (16) Pozo-Bayon, M. A.; Andujar-Ortiz, I.; Moreno-Arribas, M. A. Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 754–761.
- (17) Kritzing, E. C.; Bauer, F. F.; du Toit, W. J. Role of glutathione in winemaking: a review. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 269–277.
- (18) Andujar-Ortiz, I.; Pozo-Bayon, M. A.; Moreno-Arribas, M. V.; Martin-Alvarez, P. J.; Rodriguez-Bencomo, J. J. Reversed-phase high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the analysis of glutathione and its precursor γ -glutamyl cysteine in wines and model wines supplemented with oenological inactive dry yeast preparations. *Food Anal. Methods* **2012**, *5*, 154–161.
- (19) Kritzing, E. C.; Stander, M. A.; Du Toit, W. J. Assessment of glutathione levels in model solution and grape ferments supplemented with glutathione-enriched inactive dry yeast preparations using a novel UPLC-MS/MS method. *Food Addit. Contam. A* **2013**, *30*, 80–92.
- (20) Andujar-Ortiz, I.; C., C.; Martin-Alvarez, P. J.; Moreno-Arribas, M. A.; Pozo-Bayon, M. A. Impact of using new commercial glutathione enriched inactive dry yeast oenological preparations on the aroma and sensory properties of wines. *Int. J. Food Prop.* **2013**, DOI: 10.1080/10942912.2012.685682.
- (21) Comuzzo, P.; Tat, L.; Tonizzo, A.; Battistutta, F. Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chem.* **2006**, *99*, 217–230.
- (22) Pozo-Bayon, M. A.; Andujar-Ortiz, I.; Alcaide-Hidalgo, J. M.; Martin-Alvarez, P. J.; Moreno-Arribas, M. V. Characterization of commercial inactive dry yeast preparations for enological use based on their ability to release soluble compounds and their behavior toward aroma compounds in model wines. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10784–10792.
- (23) Rodriguez-Bencomo, J. J.; Muñoz-Gonzalez, C.; Andujar-Ortiz, I.; Martin-Alvarez, P. J.; Moreno-Arribas, M. V.; Pozo-Bayon, M. A. Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 2484–2494.
- (24) Davalos, A.; Gomez-Cordoves, C.; Bartolome, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 48–54.
- (25) Doi, E.; Shibata, D.; Matoba, T. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* **1981**, *118*, 173–184.
- (26) Moreno-Arribas, M. V.; Bartolome, B.; Pueyo, E.; Polo, M. C. Isolation and characterization of individual peptides from wine. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3422–3425.
- (27) Clowers, B. H.; Dadds, E. D.; Seipert, R. R.; Lebrilla, C. B. Dual polarity accurate mass calibration for electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using maltoligosaccharides. *Anal. Biochem.* **2008**, *381*, 205–213.
- (28) Tautenhahn, R.; Patti, G. J.; Rinehart, D.; Siuzdak, G. XCMS Online: a Web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, S035–S039.
- (29) Batiashvili, T. A.; Bezzubov, A. A.; Chichashvili, N. D.; Rodopulo, A. K. Changes in essential-oil composition of grapes during their processing. *Appl. Biochem. Microbiol.* **1981**, *16*, 450–452.
- (30) Neuenschwander, U.; Guignard, F.; Hermans, I. Mechanism of the aerobic oxidation of α -pinene. *ChemSusChem* **2010**, *3*, 75–84.
- (31) Villano, D.; Fernandez-Pachon, M. S.; Troncoso, A. M.; Garcia-Parilla, M. C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *538*, 391–398.
- (32) Battin, E. E.; Brumaghim, J. L. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem. Biophys.* **2009**, *55*, 1–23.
- (33) Parcell, S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern. Med. Rev.* **2002**, *7*, 22–44.
- (34) Hernandez-Ledesma, B.; Davalos, A.; Bartolome, B.; Amigo, L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 588–593.
- (35) Samaranyaka, A. G. P.; Li-Chan, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. *J. Funct. Food* **2011**, *3*, 229–254.
- (36) Brown, S. C.; Kruppa, G.; Dasseux, J. L. Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 223–231.
- (37) Garrett, R.; Vaz, B. G.; Hovell, A. M. C.; Eberlin, M. N.; Rezende, C. M. Arabica and Robusta coffees: identification of major polar compounds and quantification of blends by direct-infusion electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4253–4258.
- (38) Feng, X.; Siegel, M. M. FTICR-MS applications for the structure determination of natural products. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1341–1363.
- (39) Rodríguez-Melendez, R. Importancia del metabolismo de la biotina. *Rev. Invest. Clin.* **2000**, *52*, 194–199.
- (40) Alcaide-Hidalgo, J. M.; Pueyo, E.; Polo, M. C.; Martinez-Rodriguez, A. J. Bioactive peptides released from *Saccharomyces*

cerevisiae under accelerated autolysis in a wine model system. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, M276–M279.

(41) Pozo-Bayon, M. A.; Alcaide, J. M.; Polo, M. C.; Pueyo, E. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory compounds in white and red wines. *Food Chem.* **2007**, *100*, 43–47.

(42) Takayanagi, T.; Yokotsuka, K. Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 65–68.

POLICE PUBLIC CALL BOX

HOW

TO

BUILD

A

DOCTOR

